



Contribution a l'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et a la réalisation de biocapteurs

Martine Naessens

► To cite this version:

Martine Naessens. Contribution a l'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et a la réalisation de biocapteurs. Sciences de l'ingénieur [physics]. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1998. Français. NNT : 1998INPG4207 . tel-00841313

HAL Id: tel-00841313

<https://theses.hal.science/tel-00841313>

Submitted on 4 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 181 CD

THESE

présentée par

Martine NAESSENS-PEREZ

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

**DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE
ET DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE**

Spécialité Génie des Procédés

**CONTRIBUTION A L'ECOTOXICOLOGIE ANALYTIQUE
PAR DES CELLULES VEGETALES,
APPLICATIONS EN MICROSCOPIE ET A LA REALISATION DE BIOCAPTEURS**

Soutenue à Saint-Etienne le 20 octobre 1998

JURY

Monsieur M. SOUSTELLE

Président

Monsieur J-C. LECLERC

Rapporteur

Monsieur C. MARTELET

Rapporteur

Madame C. DURRIEU

Examineur

Monsieur J-C. LAFOREST

Examineur

Monsieur C. TRAN-MINH

Examineur

N° d'ordre : 181 CD

THESE

présentée par

Martine NAESSENS-PEREZ

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

**DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE
ET DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE**

Spécialité Génie des Procédés

**CONTRIBUTION A L'ECOTOXICOLOGIE ANALYTIQUE
PAR DES CELLULES VEGETALES,
APPLICATIONS EN MICROSCOPIE ET A LA REALISATION DE BIOCAPTEURS**

Soutenue à Saint-Etienne le 20 octobre 1998

JURY

Monsieur M. SOUSTELLE	Président
Monsieur J-C. LECLERC	Rapporteur
Monsieur C. MARTELET	Rapporteur
Madame C. DURRIEU	Examineur
Monsieur J-C. LAFOREST	Examineur
Monsieur C. TRAN-MINH	Examineur

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont permis ce travail ou participé à sa réalisation.

Je témoigne ma gratitude aux responsables scientifiques de L'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, notamment à

Monsieur M. Soustelle, Directeur de la Recherche,

Monsieur R. Lalauze, Directeur du Centre SPIN,

*Monsieur C. Tran-Minh, Maître de Recherches, responsable du laboratoire de Génie Enzymatique et directeur de thèse,
pour m'avoir accueillie et accordé leur confiance tout au long de ce travail.*

J'adresse mes vifs remerciements à tous les membres du jury,

à Monsieur M. Soustelle, Professeur à l'Ecole des Mines et responsable de la formation doctorale, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury,

à Monsieur J-C. Leclerc, Professeur à l'Université de Saint-Etienne pour avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux et pour sa collaboration toujours efficace et précieuse à cette recherche,

à Monsieur C. Martelet, Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude en assurant les responsabilités de rapporteur,

à Madame C. Durrieu, Ingénieur INSA et ENTPE, pour ses remarques judicieuses lors de la rédaction du mémoire et sa participation au jury,

à Monsieur J-C. Laforest, Ingénieur, Chef de Service à l'INRS pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail,

à Monsieur C. Tran-Minh, pour nos nombreuses discussions tout au long de cette étude, pour son aide efficace et chaleureuse et sa participation au jury.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à celles et ceux qui ont aidé à la réalisation de ce travail ; merci à Henri, François, Brigitte et Marie-Claude pour leurs conseils avisés, leur compétence et leur disponibilité. Je n'oublie pas la collaboration fructueuse avec de jeunes étudiants, Stéphane, Manuel et Anne-Laure auxquels j'adresse mes vœux de réussite pour leur carrière de chercheur.

A Anne-Marie, auprès de qui j'ai beaucoup appris, j'adresse de très sincères et chaleureux remerciements pour son aide discrète mais tellement efficace et je salue sa compétence et son jugement intègre et objectif.

Enfin, j'adresse mes remerciements cordiaux à Monsieur P. Jouffrey, Monsieur L. Périer-Camby, Monsieur J. Di Benedetto, Monsieur S. Mottin qui m'ont permis de m'initier à de nouvelles techniques et ont ainsi contribué à la pluridisciplinarité et à l'enrichissement du travail.

Je remercie toutes les personnes de l'Ecole qui m'ont apporté au quotidien encouragements et soutien, en particulier Monsieur R. Guyonnet, Monsieur J-P. Bigot, Monsieur B. Guilhot.

Je garde aussi précieusement le souvenir des bons moments partagés avec Iva, Laurence, Christophe, Jean-Pierre, Pascal, Christine, et Gilles. Je souhaite aux étudiants chercheurs, Bérengère, Silvia, Jean-Jacques, Jérôme, Laurent, Pascal une bonne continuation. Pour tous, je forme de sincères vœux de réussite.

Je dédie ce travail à mes proches qui, avec compréhension, générosité et enthousiasme, m'ont permis de vivre cette expérience passionnante.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. ANALYSE ECOTOXICOLOGIQUE DU MILIEU AQUATIQUE PAR LES METHODES BIOTECHNOLOGIQUES	4
I.1. Les bioessais en écotoxicologie.....	4
I.1.1. Les bioessais normalisés et les kits commercialisés.....	5
I.1.2. Les bioessais au niveau recherche.....	6
I.1.2.1. L'élément biologique est la micro-algue	7
I.1.2.2. L'élément biologique est le chloroplaste	10
I.1.3. Conclusion sur les bioessais.....	11
I.2. Les biocapteurs	12
I.2.1. Définition.....	12
I.2.2. Propriétés	13
I.2.3. Les biocapteurs environnementaux au stade prototype	14
I.2.4. Les biocapteurs au niveau recherche.....	15
I.2.5. Conclusion sur les biocapteurs	18
I.3. Bilan	19
II. PRODUITS ETUDIES	20
II.1. Les critères de sélection.....	20
II.2. Données physico-chimiques	21
II.2.1. Caractéristiques des produits	21
II.2.2. Protocole de préparation des solutions	21
II.2.3. Origine des produits	22
II.3. Données toxicologiques et écotoxicologiques.....	22
II.3.1. Les herbicides	22
II.3.2. Les métaux lourds.....	24
II.3.3. Les solvants.....	25
II.4. Réglementation et recommandations	27
II.5. Conclusion	28

CHAPITRE 2 : LES CHLORELLES

I. BIOLOGIE DES CHLORELLES	30
I.1. Utilisation biotechnologique des micro-algues.....	30
I.2. Choix motivé de <i>Chlorella vulgaris</i>	31
I.3. Présentation de <i>Chlorella vulgaris</i>	32
I.4. Aspect de la physiologie des micro-algues	33
I.4.1. Activité photosynthétique	33
I.4.2. Organisation fonctionnelle des thylakoïdes	34
I.4.2.1. Lipides et protéines.....	34
I.4.2.2. Les pigments	35
I.4.2.3. Les photosystèmes	35
I.4.2.4. Le fonctionnement du photosystème II	35
I.4.3. Les traceurs de l'activité photosynthétique.....	37
I.4.3.1. La production d'oxygène	37
I.4.3.2. La fluorescence chlorophyllienne.....	37
II. CULTURE DES CHLORELLES	40
II.1. Milieu de culture.....	40
II.2. Mise en culture et maintenance.....	40
II.3. Conditions de la culture	40

II.4. Suivi de la culture	41
II.4.1. Courbe de croissance	41
II.4.2. Spectre d'absorption de la chlorophylle brute des chlorelles.....	42
II.4.3. Evaluation de la croissance.....	42
III. IMMOBILISATION DES CHLORELLES.....	44
III.1. Méthode d'immobilisation.....	44
III.2. Choix du support pour l'immobilisation.....	45
III.3. Conservation des membranes algales	46
IV. CONCLUSION.....	47

CHAPITRE 3 : BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE A BIORECEPTEURS CHLOROPHYLLIENS

I. ETUDE EN MILIEU AQUEUX	51
I.1. Matériel et méthode.....	51
I.1.1. Chaîne de mesure	51
I.1.2. Méthode et mode opératoire.....	52
I.1.2.1. Principe de mesure de la pression partielle en oxygène	52
I.1.2.2. Etalonnage de l'électrode	52
I.1.2.3. Obtention des biorécepteurs	54
I.1.2.4. Réalisation du biocapteur	54
I.1.2.5. Conditions expérimentales.....	56
I.2. Résultats de l'étude relative aux thylakoïdes	58
I.2.1. Réaction aux herbicides	58
I.2.2. Répétabilité du biocapteur à thylakoïdes.....	59
I.2.3. Stabilité à long terme.....	59
I.2.4. Reproductibilité du biocapteur à thylakoïdes.....	60
I.2.5. Amélioration de la méthode d'immobilisation des thylakoïdes	61
I.3. Résultats de l'étude relative aux micro-algues	61
I.3.1. Effet de la charge algale	61
I.3.2. Influence du cycle d'illumination.....	62
I.3.3. Répétabilité du biocapteur algal.....	63
I.3.4. Reproductibilité du biocapteur algal.....	63
I.3.5. Effet du débit	63
I.3.6. Action des produits	64
I.3.6.1. Action de l'aminotriazole	64
I.3.6.2. Action du glyphosate.....	64
I.3.6.3. Action de l'atrazine	65
I.3.6.4. Action de la simazine.....	65
I.3.6.5. Action du diuron.....	66
I.3.6.6. Action du paraquat.....	66
I.3.6.7. Action du méthanol.....	67
I.3.6.8. Action du perchloroéthylène.....	68
I.3.6.9. Action du cadmium et du mercure	69
I.4. Conclusion de l'étude en milieu aqueux	69
II. ETUDE EN MILIEU GAZEUX.....	71
II.1. Matériel et méthode.....	71
II.1.1. Matériel	71
II.1.1.1. Cellule de mesure des vapeurs toxiques	71
II.1.1.2. Enceinte de mesure des aérosols.....	72
II.1.2. Méthode expérimentale	73
II.1.2.1. Conditions expérimentales.....	73
II.1.2.2. Mode de fonctionnement.....	74
II.1.3. Produits	74
II.2. Résultats relatifs au dosage des vapeurs.....	75
II.2.1. Etude préalable	75

II.2.2. Effet des vapeurs de méthanol.....	76
II.2.3. Résultats pour le paraquat et pour le perchloroéthylène	76
II.3. Résultats relatifs à l'étude des aérosols	77
II.3.1. Etude préalable hors toxique.....	77
II.3.1.1. Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité du biocapteur.....	77
II.3.1.2. Mesure du temps de réponse	77
II.3.1.3. Evaluation de la stabilité du biocapteur au cours du temps	77
II.3.2. Réponse du biocapteur à l'aérosol de paraquat	78
II.3.3. Comportement du biocapteur à l'aérosol de perchloroéthylène.....	78
II.4. Conclusion de l'étude en milieu gazeux	79

III. CONCLUSION DE L'ETUDE RELATIVE AU BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE . 80

CHAPITRE 4 : BIOCAPTEUR DE FLUORESCENCE ALGALE A FIBRES OPTIQUES

I. MATERIEL ET METHODE DE MESURE DE LA FLUORESCENCE	82
I.1. Matériel et montages de mesure de la fluorescence.....	82
I.1.1. Dispositifs optiques.....	82
I.1.2. Biocapteur de fluorescence algale à fibres optiques.....	84
I.2. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne.....	85
I.2.1. Détermination des longueurs d'onde expérimentales	85
I.2.1.1. Choix de la longueur d'onde d'excitation.....	85
I.2.1.2. Choix de la longueur d'onde d'émission	86
I.2.2. Principe de la mesure	86
I.2.3. Choix du mode de mesure	86
I.2.3.1. Trois dispositifs possibles de mesure	86
I.2.3.2. Mode liquide avec les suspensions algales	87
I.2.3.3. Mode solide avec les algues immobilisées couplées ou non aux fibres optiques.....	88
I.2.4. Optimisation du biocapteur à fibres optiques	88
I.2.4.1. Nature de la membrane d'immobilisation.....	88
I.2.4.2. Effet de la charge en algues.....	89
I.2.4.3. Effet de l'hydratation des membranes.....	89
I.2.4.4. Choix de la largeur des fentes du spectrofluorimètre.....	89
I.2.4.5. Effet de la distance fibres optiques - membrane algale	89
II. CARACTERISTIQUES DU SIGNAL DE FLUORESCENCE	90
II.1. Cinétique lente d'induction de la fluorescence	90
II.2. Contexte physiologique et conditions pré-opératoires	91
II.3. Effet de la température	92
II.4. Effet du pH de l'échantillon de mesure	93
II.5. Conditions opératoires pour un signal optimisé	94
III. RESULTATS	94
III.1. Stabilité du signal fluorimétrique	94
III.2. Répétabilité et reproductibilité des mesures	95
III.3. Tests de toxicité monospécifiques.....	95
III.3.1. Limite de détection comparée des suspensions algales et du biocapteur à fibres optiques.....	95
III.3.2. Réponse du biocapteur algal à fibres optiques en mode batch	96
III.3.2.1. Echantillon déposé sur la membrane sous forme de goutte ...	96
III.3.2.2. Membrane algale immergée dans l'échantillon	97
III.3.3. Réponse du biocapteur algal à fibres optiques en mode flux.....	98
III.3.4. Etude du mécanisme d'action d'un toxique, le paraquat.....	98
III.4. Conservation du biocapteur à fibres optiques hors usage	100
III.4.1. Utilisation sur une période courte mais discontinue.....	100
III.4.2. Conservation sur une longue durée	101

III.5. Comportement du biocapteur à fibres optiques fonctionnant en continu.....	101
III.6. Comportement du biocapteur de fluorescence algale en milieu complexe	102
III.6.1. Description des milieux	102
III.6.2. Etude expérimentale.....	104
III.6.2.1. Les lixiviats de pin.....	104
III.6.2.2. Les lixiviats de sapin	105
III.6.3. Discussion	106
III.6.4. Bilan relatif au test lixiviati.....	106
IV. CONCLUSION DE L'ETUDE RELATIVE AU BIOCAPTEUR DE FLUORESCENCE ALGALE	107
 CHAPITRE 5 : MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGES APPLIQUEES A LA DETECTION DE TOXIQUES 	
I. ETUDE DE CHLORELLA VULGARIS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	110
I.1. Critères de réalisation de l'étude.....	110
I.2. Méthode et matériel.....	110
I.2.1. Protocole de l'étude en microscopie électronique à balayage	110
I.2.2. Observation microscopique	111
I.3. Résultats.....	112
I.4. Discussion.....	112
I.4.1. Validation du protocole.....	112
I.4.2. Action de l'ion mercure.....	112
I.4.3. Action du perchloroéthylène	114
I.4.4. Action du paraquat	115
I.5. Conclusion relative à l'étude en microscopie électronique.....	115
II. COMPTAGE ET ANALYSE MORPHOMETRIQUE DE CHLORELLA VULGARIS PAR MICROSCOPIE OPTIQUE COUPLEE A L'ANALYSE D'IMAGES.....	116
II.1. Critères de réalisation de l'étude.....	116
II.2. Matériel et méthodes de l'analyse d'images	117
II.2.1. Matériel pour l'acquisition et le traitement d'images	117
II.2.2. Les étapes de l'analyse d'images sur "Morphopericolor"	118
II.2.3. Méthode d'étude avec la platine fixe	119
II.2.4. Méthode d'étude avec la platine motorisée	120
II.3. Etude relative au comptage des cellules.....	120
II.3.1. Méthodes usuelles.....	120
II.3.2. Résultats.....	121
II.3.2.1. Validation de la méthode de Breed.....	121
II.3.2.2. Protocole de la méthode de comptage par analyse d'images.	123
II.3.2.3. Comptage par analyse d'images sur des suspensions témoins.....	123
II.3.2.4. Comptage par analyse d'images sur des suspensions tests..	124
II.4. Etude relative à l'analyse morphométrique	125
II.4.1. Bibliographie	125
II.4.2. Paramètres de mesure.....	126
II.4.3. Résultats.....	126
II.4.4. Discussion	128
II.5. Conclusion relative à l'étude par analyse d'images.....	129
CONCLUSION GENERALE	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137
ANNEXES.....	147
PUBLICATIONS.....	163

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique.
AI :	Analyse d'Images.
ATP - ATPase :	Adénosine Tri-Phosphate - Adénosine Tri-Phosphatase.
CE ₅₀ :	Concentration Efficace du produit qui, introduit dans le milieu à tester, entraîne une hausse de 50 % du signal mesuré.
CI ₅₀ :	Concentration du produit qui, introduit dans le milieu à tester, Inhibe de 50 % le signal mesuré.
CIRC :	Centre International de Recherche sur le Cancer.
CL ₅₀ :	Concentration Létale du produit qui tue 50 % des organismes aquatiques testés.
COV :	Composés Organiques Volatils.
CSEO :	Concentration du produit Sans Effet Observé sur la population test.
CV :	Coefficient de Variation.
DJA :	Dose Journalière Admissible.
DO ₆₈₅ - DO ₇₆₀ :	Densité Optique mesurée à 685 nm respectivement à 760 nm.
ENSM-SE :	Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
FO :	Fibre Optique.
GF/C et QM/A :	Grades des filtres Whatmann®.
I% :	Pourcentage d'inhibition.
INRS :	Institut National de Recherche sur la Sécurité.
LHC :	Light-Harvesting Chlorophyll protein complex.
LMR :	Limite Moyenne Recommandée.

λ :	Longueur d'onde exprimée en nano-mètre.
M :	Mole par litre.
MEB :	Microscopie Electronique à Balayage.
MET :	Microscopie Electronique à Transmission.
Milieu LC :	Milieu minéral nutritif pour la culture des algues selon Lefebvre-Czarda.
μ :	Moyenne.
NADP [•] -NADPH,H [•] :	NicotinAmide Dinucléotide Phosphate (forme oxydée, forme réduite).
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé.
PMT :	Photomultiplicateur.
PS I, PS II :	Photosystème I, Photosystème II.
ppm, ppb :	Partie par million, partie par billion.
PVC :	PolyVinyle Chlorure.
QA, QB :	Quinone A, Quinone B.
R :	Coefficient de corrélation.
σ :	Ecart-type.
SD :	Déviatiion Standard.
UA :	Unité Arbitraire.
VME :	Valeur Moyenne de limite d'Exposition.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les lois récentes sur l'eau et sur l'air reconnaissent à chacun "le droit de disposer d'une eau, de respirer un air qui ne nuisent pas à sa santé". Les législations française et européenne officialisent des préoccupations justifiées, déjà anciennes sur la qualité de l'eau, plus récentes sur la qualité de l'air et qui aujourd'hui sont incontournables. La nature doit être préservée, c'est une question de santé publique et un enjeu pour les générations futures.

Eau, air et sol sont les exutoires naturels des activités humaines, mais aussi les ressources vitales où nous puisons directement ou indirectement (via la chaîne alimentaire) nos nutriments. C'est pourquoi, ces trois compartiments sont aujourd'hui très surveillés. A l'heure actuelle, des centaines de molécules chimiques sont contrôlées dans l'eau et dans l'air. Conformément à la réglementation, la détection et le dosage de ces molécules sont réalisés à l'aide d'instruments d'analyse conventionnels tels que spectromètres et chromatographes. Ces appareils offrent des méthodes de mesure fiables, souvent normalisées. Cependant, ils sont coûteux, volumineux, exigeants sur le plan technique et nécessitent en outre une étape souvent longue de préparation de l'échantillon.

Pourtant la demande en analyse dépasse largement le cadre réglementaire. La démarche sur le terrain vise la surveillance permanente sur site afin d'alerter le plus tôt possible en cas de danger. Cette prudence est de rigueur pour le risque sanitaire et pour la protection des installations industrielles et des captages ; elle nécessite des méthodes utilisables en continu, à réponse rapide, automatisables, sensibles à une grande variété de molécules chimiques. En effet, toutes les sources de pollution ne sont pas répertoriées, *a fortiori* réglementées, il faut donc envisager la possibilité de découvrir de nouveaux dangers. C'est là que les méthodes biotechnologiques trouvent leur place et leur intérêt à côté des méthodes conventionnelles. Elles possèdent en effet les qualités requises pour révéler rapidement un danger pour le milieu naturel et l'homme.

C'est dans le cadre de l'analyse biotechnologique que s'inscrit notre étude. Elle propose de nouvelles méthodes d'analyse se présentant comme des essais de faisabilité et non comme des études exhaustives.

Dans un premier temps, prenant comme fil directeur la mise au point d'un outil de détection à spectre large, fonctionnant en continu, à faible coût, nous avons conçu et testé deux types de biocapteur. Le biocapteur est un outil compact qui associe intimement élément biologique et capteur.

Dans un deuxième temps, reconnaissant l'intérêt des bioessais pour la compréhension des mécanismes d'action du toxique sur la matière vivante, nous choisissons deux approches. L'une est basée sur la microscopie électronique à balayage ; l'autre, aujourd'hui en plein essor,

fait ses preuves dans le contrôle qualité industriel et médical mais elle est encore peu présente dans les études portant sur la surveillance de l'environnement : il s'agit de l'analyse d'images.

Dans le 1^{er} chapitre, deux aspects bibliographiques sont abordés. Un état de l'art des méthodes biotechnologiques utilisées en écotoxicologie du milieu aquatique est dressé de façon non exhaustive ; deux méthodologies, bioessais et biocapteurs, sont comparées. Puis les produits sélectionnés pour l'étude sont présentés sur le plan physico-chimique, (éco)toxicologique et réglementaire ; il s'agit de 7 herbicides, 3 solvants, 2 métaux lourds.

Le 2^{ème} chapitre est consacré aux chlorelles (*Chlorella vulgaris*), algues unicellulaires d'eau douce, très utilisées dans les laboratoires. Des aspects de leur biologie et de leur physiologie sont rappelés. Nous indiquons le protocole de développement de la culture et la méthode d'immobilisation des algues que nous avons mise au point. Les chlorelles sont fixées sur des membranes que l'on peut intégrer au sein d'un biocapteur.

Les chapitres suivants présentent les 3 volets expérimentaux.

Dans le 3^{ème} chapitre, nous étudions deux biocapteurs ampérométriques fondés sur la mesure de la pression partielle en oxygène ; l'électrode de pO₂ est équipée soit d'une membrane à micro-algues, soit d'une membrane porteuse de thylakoïdes extraits des cellules végétales. Le principe de fonctionnement de ce type de biocapteur a déjà été exploité pour des mesures en milieu liquide.

Nous apportons notre contribution en élargissant le spectre des produits détectés par cette génération de biocapteur et en proposant une nouvelle association permettant son extension à des mesures en phase gazeuse. Nous évaluons les performances du biocapteur algal en conditions atmosphériques compte-tenu du besoin croissant de méthodes analytiques dans ce compartiment.

Dans le 4^{ème} chapitre, nous recherchons la faisabilité d'un deuxième type de biocapteur : le biocapteur de fluorescence algale qui est composé d'une membrane à micro-algues adaptée à l'extrémité d'un faisceau de fibres optiques. La partie bibliographique a montré, en effet, que la fluorescence chlorophyllienne mesurée sur des algues en suspension permet d'apprécier la vitalité des cellules.

Nous évaluons ici les capacités de ce biocapteur dans différentes situations expérimentales, notamment en présence de solutions monospécifiques et sur un milieu naturel.

Au 5^{ème} chapitre, l'approche méthodologique est différente ; elle est basée sur le recours à la microscopie soit pour une étude de surface des cellules en microscopie électronique à balayage soit par couplage avec l'analyse d'images pour le suivi morphométrique des cellules et la cinétique des divisions cellulaires sous l'action d'un toxique.

CHAPITRE 1

ANALYSE ECOTOXICOLOGIQUE DU MILIEU AQUATIQUE PAR LES METHODES BIOTECHNOLOGIQUES

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Ce chapitre traite des méthodes biotechnologiques d'analyse de l'eau et présente les produits sélectionnés pour l'étude.

I - ANALYSE ÉCOTOXICOLOGIQUE DU MILIEU AQUATIQUE PAR DES MÉTHODES BIO-TECHNOLOGIQUES

Nous présentons ici l'éventail des tests biologiques de l'analyse de l'eau en privilégiant ceux qui recourent au matériel végétal.

Nous n'évoquons que le milieu aquatique car notre étude expérimentale est réalisée essentiellement en phase aqueuse, d'autre part, les travaux portant sur l'analyse atmosphérique par des méthodes biotechnologiques sont rares. Depuis la loi sur l'air de 1996 (n°96-1236), les méthodes analytiques ont pris un grand essor mais elles sont presque uniquement physico-chimiques.

II - PRODUITS ÉTUDIÉS

La sélection des produits sera justifiée. Les 12 composés choisis appartiennent à 3 catégories :

- les herbicides
- les solvants
- les métaux lourds.

Des données physico-chimiques concernant ces produits sont présentées. Des rappels bibliographiques font le point sur leurs effets toxiques, les mécanismes d'action sur la matière vivante ainsi que sur la réglementation.

I. ANALYSE ECOTOXICOLOGIQUE DU MILIEU AQUATIQUE PAR LES METHODES BIOTECHNOLOGIQUES

Il existe aujourd'hui une multitude de tests ayant pour objectif la détection d'une toxicité globale du milieu aquatique ou la mise en évidence d'un polluant dans ce milieu grâce à l'effet produit sur un élément vivant.

Ces tests écotoxicologiques sont disponibles sous différentes présentations : tests de laboratoire normalisés, kits et biocapteurs commercialisés, études issues de la recherche.

Cette pluralité repose aussi sur la diversité des éléments biologiques utilisés ainsi que sur les conditions d'application et d'utilisation des tests (tests au laboratoire, *in situ*, détection en continu ou en mode discontinu).

Durant la dernière décennie, les problèmes sanitaires et d'environnement, une réglementation renforcée ont stimulé les recherches dans ce domaine : l'abondance des publications a sans doute contribué à l'apparition de nouvelles revues d'écotoxicologie et a multiplié les rencontres au niveau international.

Nous présentons, sans être exhaustif, un état de l'art dans le domaine de l'analyse de l'eau. Nous distinguons deux modes d'analyse complémentaires : bioessais et biocapteurs. Généralement, les bioessais sont mis en oeuvre au laboratoire et validés par des tests répétitifs alors que les biocapteurs sont davantage destinés aux mesures en continu sur le terrain.

I.1. Les bioessais en écotoxicologie

Les bioessais sont des tests de laboratoire impliquant un élément biologique qui peut être :

- une molécule (enzyme, anticorps)
- un organite cellulaire (chloroplaste, mitochondrie...)
- un organisme entier (bactérie, algue, invertébré, poisson...).

L'impact de la toxicité est établi avec des concentrations fortes pour un temps d'exposition bref (quelques heures), court (24 à 96 heures, ou plus) ; ces tests entrent pour la plupart dans la catégorie des tests de toxicité aiguë. Le résultat est donné sous forme codifiée ; les valeurs sans effet et les concentrations toxiques modifiant de 50% le paramètre

mesuré sont retenues, on les désigne respectivement par CSEO, CE₅₀, CL₅₀, CI₅₀ [Gaujous, 1994]. Les définitions précises sont données dans la liste des abréviations et symboles.

L'effet toxique est révélé par la variation d'un paramètre biochimique choisi spécifiquement. Ainsi peut-on évaluer :

- l'activité d'une enzyme (déshydrogénase, β -galactosidase)
- l'affinité de l'anticorps pour son ligand
 - * par le couplage anticorps-enzyme
 - * par le couplage anticorps-fluorophore
- la croissance d'une population de micro-organismes (bactéries, algues)
 - * par le comptage des cellules
 - * par l'évaluation de la biomasse
 - * par le dosage d'un constituant cellulaire caractéristique
- le métabolisme ATPasique (espèces bioluminescentes)
- le métabolisme de la photosynthèse des végétaux
 - * par le dosage de la chlorophylle, *in vitro*
 - * par la mesure de fluorescence chlorophyllienne, *in vitro* et *in vivo*
 - * par la mesure du rejet d'oxygène ou de l'intensité du courant dû à la circulation d'électrons dans les réactions redox.
- le métabolisme respiratoire des cellules
 - * par la mesure du rejet de dioxyde de carbone
 - * par la mesure de l'absorption d'oxygène
- la mobilité par suivi visuel ou électronique (mobilité antennaire des daphnies, mouvements valvaires des moules).

Cette liste reprend les paramètres les plus couramment étudiés. Certains sont très spécifiques (activité enzymatique, métabolisme ATPasique), d'autres évaluations sont plus globales (croissance).

Des tests font l'objet d'une normalisation, d'autres sont à l'état de projet en phase de développement ou encore à l'état de recherche.

Les informations qui suivent proviennent de deux articles de synthèse [Bitton et Koopman, 1992 ; Rogers, 1995] et d'un auteur français [Gaujous, 1994].

1.1.1. Les bioessais normalisés et les kits commercialisés

Ces tests sont effectués de façon ponctuelle sur des échantillons naturels ou industriels, lors de catastrophes naturelles, d'accidents ou de suspicion de pollution. Ils évaluent la toxicité globale de l'échantillon.

Voici quelques bioessais normalisés relevés dans la norme française et utilisés par les laboratoires d'écotoxicologie compétents ; les références sont les indices de classement Afnor.

Intitulé du test normalisé	Indice de classement Afnor
Détermination de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i>	T90 - 301
Détermination de la mortalité de jeunes poissons, <i>Brachydanio rerio</i>	T90 - 303
Détermination de l'inhibition de la croissance de <i>Selenastrum capricornutum</i>	T90 - 304

Tab. 1 : Exemples de bioessais normalisés (Afnor).

Des kits dont la fiabilité est établie sont disponibles aux Etats-Unis, en Allemagne et en France ; ils sont utilisables en laboratoire, parfois sur le terrain et viennent compléter la gamme des tests normalisés. On peut citer :

Intitulé du test commercial	Organisme fabricant
Détection immuno-enzymatique des triazines	Seres, Transia
Automicrotox (basé sur la bioluminescence de <i>Photobacterium phosphoreum</i>)	Microbics, Groupe Environnement SA
Valvomètre (basé sur l'activité valvaire des moules)	Micrel-Ifremer

Tab. 2 : Exemples français de bioessais commercialisés.

I.1.2. Les bioessais au niveau recherche

Étant donné l'abondance des travaux et le cadre de notre étude, nous n'avons retenu que les recherches portant sur des éléments végétaux :

- les micro-algues y compris les cyanoprocaryotes,
- et les chloroplastes, organites cellulaires réalisant la photosynthèse.

1.1.2.1. L'élément biologique est la micro-algue

Les algues sont cultivées dans des volumes variables : flacons (100 à 250 mL), bouteilles (1 à 2 L). Les paramètres de la culture - milieu nutritif - éclairage - température - doivent être optimaux ; il y a peu de variation d'une espèce à l'autre. La croissance active est maintenue par un éclairage permanent ou à photopériode longue (16 h) sous une intensité forte (en moyenne $300 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La température est voisine de 20°C .

On ajoute à la culture au temps 0 une solution de toxique ou un échantillon provenant d'un milieu naturel, d'un effluent. Ici, l'effet est relevé après 2 à 7 jours parfois 15 et comparé au témoin.

Le plus souvent, les bioessais utilisent des suspensions algales, cependant quelques essais ont eu lieu avec des algues temporairement immobilisées, soit pendant l'incubation [Bozeman et al., 1989], soit pendant la mesure [Merlin, 1994].

Deux approches analytiques sont employées :

1/ L'effet du toxique sur la croissance algale est estimé par l'évolution de la population, selon différentes méthodes :

- comptage des cellules
- évaluation de la biomasse sèche
- détermination de la densité optique de la suspension algale
- dosage *in vitro* de la chlorophylle contenue dans les cellules.

2/ L'effet du toxique sur les algues est suivi conjointement par le comptage cellulaire et par un autre paramètre de viabilité tel que :

- le métabolisme énergétique par dosage de l'ATP
- le métabolisme photosynthétique par fluorimétrie de la chlorophylle ou détection ampérométrique
- le cycle cellulaire par repérage des divisions cellulaires.

Les Tableaux 3 et 4 recensent des travaux représentatifs de ces recherches.

Algues	Produits testés	Évaluation	Résultat partiel	Références travaux
Cyanoprocaryotes: <i>Anabaena</i> Vertes : <i>Selenastrum capricornutum</i>	Atrazine Hexazinone	à 7 jours, Biomasse sèche et Dosage chlorophylle <i>a</i>	Arrêt de croissance avec l'atrazine, Pour <i>Anabaena</i> Cl ₅₀ = 0,76 ppm Pour <i>Selenastrum</i> Cl ₅₀ = 0,25 ppm	Abou-Waly et al., 1991
Cyanoprocaryotes: <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i>	Triazines Phénylurées	sur 7 jours Comptage cellulaire Dosage chlorophylle <i>a</i> Taux de croissance	Dosage chlorophylle <i>a</i> avec les triazines, Cl ₅₀ = 0,13 ppm	Abou-Waly et al., 1993
Vertes : <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glyphosate Alachlor Chlortoluron Isoproturon	à 96 h Comptage cellulaire	Pour le glyphosate Cl ₅₀ = 1 ppm Pour alachlor, chlortoluron, Cl ₅₀ = 0,1 ppm Pour isoproturon, Cl ₅₀ = 0,02 ppm	Anton, 1993
Vertes : <i>Selenastrum capricornutum</i> immobilisées dans des billes d'alginate	Cadmium Cuivre Glyphosate Paraquat Hydrothol Pentachlorophénol	à 48 h Dosage chlorophylle <i>a</i>	Avec le cadmium Cl ₅₀ = 12,9 ppm Avec le glyphosate Cl ₅₀ = 26 ppm Avec le paraquat Cl ₅₀ = 7,8 ppm	Bozeman et al., 1989

Tab. 3 : Bioessais basés sur l'inhibition de la croissance des micro-algues.

Algues	Produits testés	Évaluation	Résultat partiel	Références travaux
Vertes : <i>Chlorella fusca</i>	Triazines Phénylurées	Mesure de la fluorescence <i>in vivo</i>	Avec l'atrazine CE ₅₀ = 3,3 µM Avec la simazine CE ₅₀ = 2,2 µM Avec le diuron CE ₅₀ = 0,9 µM	Conrad et al., 1993
Vertes : <i>Selenastrum capricornutum</i>	Effluents de papeteries	Mesure de la luminescence (test ATP) sur microplaque	Certains inhibiteurs, d'autres stimulants	Kwan, 1989
Vertes : <i>Scenedesmus subspicatus</i>	Isoproturon Xylylxylène	Fluorescence <i>in vivo</i> de la chlorophylle après immobilisation des algues	Avec l'isoproturon CE ₅₀ = 100 ppb Avec le xylylxylène Cl ₅₀ = 2 ppm	Merlin, 1994
Vertes : <i>Selenastrum capricornutum</i>	Cadmium	Comptage cellulaire Cycle cellulaire 15 jours	Cl ₅₀ = 250 ppm sur le % de cellules en division	Nielsen, 1993
Vertes : <i>Chlorella</i> sp Brunes : <i>Phaedactylum tricornutum</i>	Effluents industriels avec trifluraline et propanil	Comptage cellulaire Assimilation du CO ₂ Fluorescence de la chlorophylle <i>in vitro</i> à 7 jours	Inhibition de la fluorescence 2 fois + forte pour <i>Chlorella</i>	Okay, 1994
Vertes : <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Gardoprim	Mesure de la fluorescence <i>in vivo</i>	Limite de détection 5 ppb	Ruth, 1994
Vertes : <i>Dunaliella tertiolectra</i>	Atrazine Diuron Hg Cl ₂	Production d'oxygène Fluorescence de la chlorophylle <i>in vivo</i>	Production d'oxygène : Avec l'atrazine CE ₅₀ = 1,25 µM Avec le diuron CE ₅₀ = 1 µM Avec Hg Cl ₂ Cl ₅₀ = 140 µM	Samson, 1988
Vertes : <i>Chlorella</i> sp	Atrazine Simazine	Fluorescence de la chlorophylle <i>in vivo</i> 48 h	Avec l'atrazine limite détection 2 ppb Avec la simazine limite détection 1 ppb	Weston, 1991

Tab. 4 : Bioessais basés sur l'inhibition du métabolisme des micro-algues.

1.1.2.2. L'élément biologique est le chloroplaste

Les chloroplastes sont de gros organites cellulaires renfermant de nombreuses vésicules aplaties appelées thylakoïdes. Ces éléments sont très étudiés car responsables de l'activité photosynthétique des végétaux.

Outre l'étude fondamentale de la photosynthèse, chloroplastes et thylakoïdes sont aussi exploités dans des applications analytiques. Leur utilisation implique :

- l'extraction des chloroplastes de la cellule suivie d'une fragmentation pour l'obtention des thylakoïdes
- la conservation *in vitro*, délicate en raison de leur fragilité
- l'incubation en présence du toxique : herbicides ou métaux lourds
- le suivi de l'activité métabolique, traditionnellement par recours à l'électrode ampérométrique.

Carpentier conduit un travail approfondi sur les chloroplastes depuis une décennie. Il a comparé deux modes d'évaluation de leur activité métabolique. En effet, l'électrode ampérométrique équipée d'une membrane hydrophobe sensible à l'oxygène mesure la production de ce gaz lorsque les chloroplastes sont éclairés ; en revanche, l'électrode seule en présence d'accepteurs d'électrons introduits dans le milieu de mesure permet le suivi de l'activité d'oxydo-réduction des chloroplastes en action. Deux couples redox de faible masse moléculaire sont retenus dans ce contexte ; le ferrocyanure de potassium est lipophile alors que la benzoquinone est lipophile. A la lumière, le médiateur est réduit par l'activité biologique et ultérieurement réoxydé à l'électrode de travail réglée sous tension appropriée par rapport à l'électrode de référence ; c'est ce transfert d'électrons de l'élément biologique à l'électrode qui produit un courant continu de faible amplitude proportionnel à l'activité métabolique.

Carpentier et son équipe ont optimisé le signal traduisant l'activité métabolique de suspension de chloroplastes ou de thylakoïdes [Lemieux et Carpentier, 1988]. Ils ont aussi utilisé des substances perturbatrices tels que les herbicides, les métaux lourds [Carpentier et al., 1991].

L'inconvénient est que les chloroplastes et les thylakoïdes ne sont utilisables que quelques heures après leur extraction de la cellule. Par contre, ils peuvent être conservés dans l'azote liquide.

Nous citons deux études portant sur des extraits de feuilles d'épinard, leurs résultats sont représentatifs des niveaux de réponse couramment obtenus par mesure du courant photo-induit :

- avec le **diuron**, l'activité métabolique redox est réduite de moitié pour une concentration de 1 μ M [Carpentier et al., 1991 ; Tamura et al., 1994].
- avec les **chlorures de plomb et de cadmium**, une concentration de 1 mM abaisse de 50 % l'activité métabolique redox [Carpentier et al., 1991].

1.1.3. Conclusion sur les bioessais

Dans l'ensemble, ces tests donnent des résultats dont les coefficients de variation (CV) varient de 5 à 20 % suivant les espèces.

A l'heure actuelle, les organismes unicellulaires sont les plus exploités pour la détection des toxiques , en particulier :

- les micro-algues (algues vertes)
- et les bactéries.

Les chloroplastes d'utilisation plus délicate sont seulement présents dans les études de laboratoire, alors que les animaux présentent un handicap au niveau de la maintenance de l'élevage (lourdeur + coût).

Les produits étudiés sont variés ; ils sont choisis en fonction des exigences de la réglementation et des situations de terrain. Pour la détection, les éléments biologiques sont sélectionnés en fonction de leur sensibilité aux produits ; avec les éléments végétaux, deux catégories de produits sont privilégiées :

- les herbicides, en particulier, triazines et phénylurées,
- et les métaux lourds.

Mais d'autres catégories, solvants, acides organiques, dérivés du phénol, sont passées au crible avec les autres biorécepteurs (invertébrés, bactéries).

Les résultats des biotests concernent la toxicité globale du milieu ou bien, si l'échantillon ne contient qu'une substance à surveiller, ils peuvent évaluer la concentration de la substance après étalonnage.

En dépit des particularismes inhérents à chaque étude (choix de l'espèce, du toxique, durée d'incubation...) des comparaisons sont établies : elles révèlent des similitudes, le plus souvent, elles illustrent un principe souvent énoncé : *en écotoxicologie, il est indispensable d'avoir recours à une batterie de tests*. L'exemple suivant le démontre.

Tomulka (1993) travaille en bioluminescence avec les bactéries marines, *Photobacterium phosphoreum* ; il "reproduit" le test Microtox si ce n'est que ces bactéries sont directement extraites du milieu de culture alors que dans le test normalisé, les bactéries sont lyophilisées. Cet unique détail amène des divergences sur un panel de 14 produits testés :

- le test Microtox est plus sensible à 6 molécules
- le biotest à élément frais est plus sensible à 6 autres molécules
- les résultats sont identiques dans les 2 autres cas.

1.2. Les biocapteurs

Le premier biocapteur date de 1967, il s'agit d'une électrode enzymatique permettant le dosage du glucose dans une solution biologique [Updike et Hicks, 1967].

Depuis ce temps, les biocapteurs ont suscité de nombreuses recherches d'abord dans le domaine médical et le domaine agro-alimentaire, plus récemment dans le domaine de l'environnement. Cet engouement repose sur les qualités des biocapteurs révélées au cours des études et par quelques réalisations disponibles au niveau industriel, ainsi que pour le public. Citons les biocapteurs de l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique pour le suivi des fermentations et la grande réussite du lecteur de glycémie. Le diabétique dispose de plusieurs modèles lui permettant à domicile le suivi de la glycémie et bénéficie ainsi d'un meilleur contrôle de sa maladie [Tran-Minh, 1993].

Aujourd'hui, les biocapteurs sont porteurs de gros espoirs dans le domaine de l'environnement. Les publications sont nombreuses, des congrès internationaux leur sont consacrés chaque année et pour ne citer que la France, le CNRS a démarré en 1994 un programme de recherches pluridisciplinaires pour les technologies de l'environnement dont la vocation est de promouvoir le développement des biocapteurs pour le suivi de la qualité des eaux, alors que l'ADEME s'intéresse aux compartiments air et sol [Gueneau et Etienne, 1994].

Après avoir présenté les composantes du biocapteur, nous parlerons de quelques prototypes utilisés sur le terrain et des travaux de recherches les concernant.

1.2.1. Définition

Un biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologique appelé biorécepteur intimement lié à un transducteur. Le biorécepteur reconnaît de façon spécifique une molécule présente dans le milieu et émet une variation biochimique que le transducteur convertit en un signal électrique mesurable. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure [Tran-Minh, 1991].

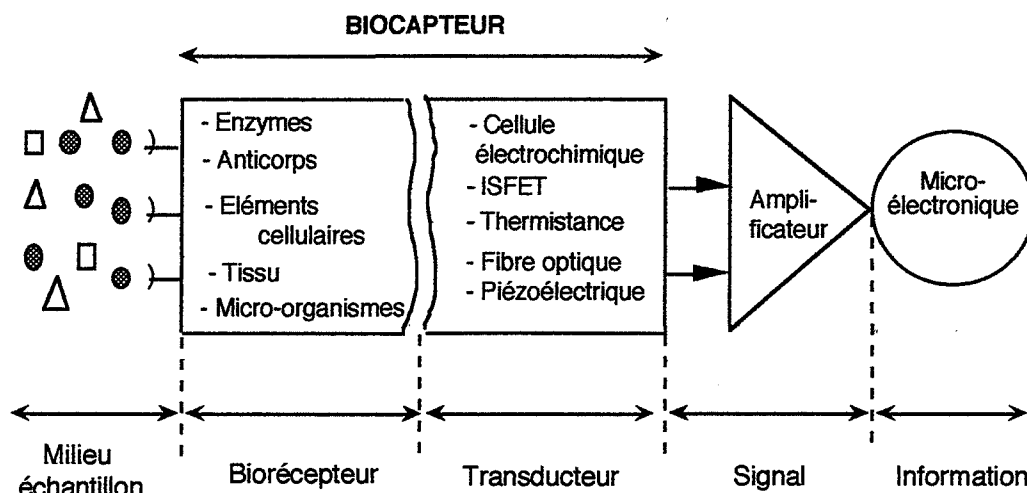


Fig. 1 : Divers éléments constituant la chaîne de mesure pour biocapteur.

Des discussions entre spécialistes pourraient faire évoluer cette première définition. En effet, de nombreuses réalisations revendiquent aujourd'hui l'appellation de biocapteur tout en ne remplissant pas les critères classiques : soit l'immobilisation de l'élément biologique n'existe pas, soit la dissociation entre les 2 composantes du biocapteur est marquée. Quoiqu'il en soit, le biocapteur possède des propriétés attractives pour l'industriel et le personnel qui travaille sur le terrain.

1.2.2. Propriétés

Le biocapteur, outre ses performances métrologiques, est un outil *compact*, voire *miniaturisable*, *automatisable*, souvent *peu onéreux* de la fabrication à l'utilisation en passant par la maintenance.

Le biocapteur est un outil *modulable* ; le Tableau 5 récapitule les biorécepteurs et les transducteurs possibles. Ainsi, une grande variété de produits peut être détectée par les biocapteurs. On peut citer les métaux, pesticides, dérivés phénoliques, PCB, nitrates, ammonium [Rogers, 1995].

Biorécepteurs Transducteurs		Enzyme	Anticorps	Elément cellulaire	Cellule Micro-organisme	Tissu animal/ végétal
Electro- chimique	ampérométrique	xxx	xx	x	xx	xx
	potentiométrique	xxx	xx		xx	x
ISFET		xxx	x			
Thermométrie		x	x			
Optique (Fibres, SPR)		xx	x			x
Piézo-électrique (Quartz, SAW)		xx	xx			

Tab. 5 : Combinaisons (biorécepteur-transducteur) testées.

Etat approximatif des recherches dans le domaine des biocapteurs : (x) recherches de laboratoire, (xx) recherches + prototypes, (xxx) recherches + appareils commercialisés.

ISFET : ion sensitive field effect transistor, SPR : surface plasmon resonance, SAW : surface acoustic wave.

1.2.3. Les biocapteurs environnementaux au stade prototype

Voici trois réalisations de procédé en ligne pour le suivi écotoxicologique des eaux de surface et le traitement des effluents.

♦ *Le Biotoxitel*

C'est un biocapteur mis à l'essai sur les eaux des rivières qui assure un historique de l'évolution de la qualité de l'eau et fonctionne comme un système d'alerte en cas de forte pollution [Jacques et al., 1994].

Des algues, les *Chlorella* et les *Scenedesmus*, associées à une électrode de pO_2 sont soumises à un flux provenant d'un captage. Le dispositif sur berge admet une régulation des divers paramètres, un traitement électronique du signal et un modem pour le recueil des informations à distance.

Le Biotoxitel est sensible à des herbicides, des métaux lourds et aux phénols.

♦ *Le Rod Tox* (Rapid Oxygen Demand and Toxicity Tester)

Cet automate a été développé conjointement par le laboratoire d'Ecologie Microbiologique de l'Université de Gand et par Kelma NV, Niel.

Il est installé dans un laboratoire du département Environnement de la Société ESSO et dans une usine de traitement des eaux usées où il fonctionne en ligne à l'entrée de l'installation.

L'automate travaille avec une boue activée dont on suit la consommation en oxygène [Vanrolleghem et al., 1994]. En présence de toxiques, la demande en oxygène des bactéries

des boues est abaissée, le signal du biocapteur révèle alors la présence de la pollution. Nous rapportons les performances du Rod Tox d'après Kong (1993) pour trois toxiques :

	Temps réponse (min.)	Cl50 (ppm)
Dichlorophénol	5	11,7
Cu ²⁺	5	12,8
CN ⁻	15	0,81

Tab. 6 : Quelques toxiques détectés par Rod Tox.

♦ *L'électrode à cholinestérase*

Ce prototype résulte d'une collaboration ENSM-SE, C.G.Eaux [El Yamani, 1987].

Il équipe avec d'autres capteurs une station d'alerte établie par la CGE sur la Marne [Joret, 1991].

Le dispositif comporte une électrode pH couplée à une enzyme sensible aux produits neurotoxiques, la butyrylcholinestérase. Cette enzyme est proche de l'acétylcholinestérase qui, *in vivo*, permet la transmission des messages nerveux. En présence de carbamates et d'organophosphorés, l'hydrolyse du chlorure de butyrylcholine catalysée par la butyrylcholinestérase se trouve inhibée. Le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique dépend linéairement de la concentration du neurotoxique.

L'automate fonctionne en continu réalisant une mesure toutes les 20 minutes. En cas de forte inhibition, une procédure de régénération de l'enzyme est prévue de même qu'un contrôle de la force ionique du milieu car certains ions interfèrent avec la mesure.

Ce système est sélectif mais non spécifique car il répond à un spectre large de carbamates et d'organophosphorés, avec une limite de détection allant de 3 à 10 ppb suivant les produits.

1.2.4. Les biocapteurs au niveau recherche

Des articles de synthèse font régulièrement le point et la promotion des biocapteurs. Entre autres, l'article de Paddle (1996) propose de nombreux exemples et montre l'immense champ des recherches possibles.

♦ *Les biocapteurs enzymatiques*

Les biocapteurs enzymatiques ont été les premiers étudiés et restent encore aujourd'hui en bonne position. Nous présentons deux études représentatives des types de biocapteur testés et des domaines d'applications. Alors que dans certains domaines, on cherche à doser le substrat du biorécepteur, en écotoxicologie le dosage du produit toxique se fait par mesure de l'inhibition de l'activité enregistrée par le biocapteur.

- *biocapteur potentiométrique à butyrylcholinestérase* [Kumaran et Tran-Minh, 1992]

Des travaux de recherche ont permis le perfectionnement de l'automate à cholinestérase précédemment décrit (1.1.2.3, chap.1) ; il s'agit d'améliorer la sensibilité du biocapteur et la stabilité du biorécepteur en perfectionnant les techniques d'immobilisation de l'enzyme [Kumaran et Tran-Minh, 1992-a]. Les limites de détection deviennent inférieures à 5 ppb, voire inférieures à 1ppb.

L'intégration du biocapteur dans un système FIA (Flow Injection Analysis) autorise à un moindre coût un fonctionnement en continu [Kumaran et Tran-Minh, 1992-b].

- *biocapteur ampérométrique à polyphénoloxydase* [Besombes, 1994]

La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de 2 substrats : la dopamine et le catéchol. Elle est immobilisée sur un film polymère au contact de l'électrode de pO_2 .

Le biocapteur permet le dosage de produits toxiques par inhibition de l'activité enzymatique :

- l'oxydation de la dopamine est réduite en présence d'atrazine
- l'oxydation du catéchol est réduite en présence de dérivés du phénol.

	Limite de détection (μM)	CI ₅₀ (μM)
2- Chlorophénol	0,2	2 100
3,5-Dichlorophénol	0,4	65
Atrazine	4	250

Tab. 7 : Performances du biocapteur à polyphénoloxydase.

♦ *Les biocapteurs utilisant des fragments biologiques*

Des éléments subcellulaires (chloroplastes) et des tissus sont utilisés en association avec des transducteurs électrochimiques [Rawson, 1989].

Mazzei (1995) exploite la forte activité oxydante des **tissus** de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Il fixe une fine pellicule végétale sur l'extrémité de l'électrode à pO_2 et forme ainsi un biocapteur de durée de vie 14 jours réagissant à l'atrazine. Pour une incubation de 20 minutes, la limite de détection est de 10 μM et la CI₅₀ atteint 90 μM .

Dans cette rubrique, les **chloroplastes des cellules végétales** ont suscité un vif intérêt. Ces éléments, comme nous l'avons dit précédemment, sont peu stables, or les méthodes d'immobilisation nécessaires dans la perspective d'un biocapteur sont attrayantes car elles semblent stabiliser l'élément subcellulaire [Carpentier et al., 1991]. Depuis les années 80, différentes méthodes sont utilisées, les chloroplastes étant des édifices moléculaires de grande taille (2 à 5 μm), ce sont des méthodes physiques d'inclusion qui sont préférées. Elles ont

permis de tester sur les chloroplastes ou leurs thylakoïdes l'effet de molécules employées comme herbicides.

Le Tableau 8 récapitule les résultats partiels de trois équipes :

Biorécepteur	Immobilisation	Détection	Résultat (Cl50)	Auteurs
Thylakoïdes (feuille d'épinard)	Matrice albumine + Glutaraldéhyde	O ₂ (Electrode de pO ₂)	0,5 µM Diuron 1 mM PbCl ₂ 2 mM CdCl ₂	Carpentier et al., 1991
	Matrice albumine + Glutaraldéhyde	Courant photo- induit (Electrode ampérométrique)	10 µM Atrazine	Purcell et al., 1990
	Gel de Polyvinyl-alcool	H ₂ O ₂ (Electrode ampérométrique)	2 µM Atrazine 0,4 µM Diuron	Rouillon et al., 1995

Tab. 8 : Résultats obtenus avec des biocapteurs à thylakoïdes.

♦ *Les biocapteurs à micro-organismes*

Levures, algues et bactéries sont ici les éléments biorécepteurs.

Rawson a été un pionnier dans ce domaine ; dès 1989, il présente un biocapteur constitué de cyanoprocaryotes du genre *Synechococcus* immobilisées dans un gel d'alginate, associées à un transducteur ampérométrique ; utilisant le principe exposé précédemment pour les chloroplastes (1.1.2.2, chap.1), le biocapteur mesure l'inhibition du courant photo-induit par la présence de substances toxiques à l'algue. La benzoquinone s'avère plus toxique que le ferrocyanure de potassium comme médiateur d'oxydo-réduction chez *Synechococcus* [Rawson et al., 1989].

Plus tard, Pandard approfondit l'étude en comparant d'une part, les deux types de transducteurs ampérométriques, d'autre part deux familles d'algues, et les méthodes d'immobilisation. Le ferrocyanure de potassium est inopérant avec des cellules entières et la benzoquinone est toxique pour certaines algues aux doses nécessaires. En fait, si on privilégie la facilité d'utilisation, la fiabilité et la stabilité de la méthode, l'électrode de pO₂ est préférable [Pandard et al., 1993].

Le Tableau 9 suivant présente succinctement ces deux études :

Biorécepteur immobilisé	Détection	Toxiques	Auteur
Cyanoprocaryotes + gel alginate	Courant photo-induit	Herbicides	Rawson, 1989
Cyanoprocaryotes + membranes	Courant photo-induit et O ₂	Herbicides Métaux Cyanures	Pandard et al., 1993

Tab. 9 : Deux exemples de biocapteurs à micro-algues.

1.2.5. Conclusion sur les biocapteurs

Les biocapteurs malgré une bonne adéquation entre les besoins analytiques et leurs propriétés sont encore peu présents sur le terrain ; les freins à leur développement se situent à deux niveaux :

- niveau réglementation : la législation n'impose pas une surveillance en continu qui devrait privilégier le biocapteur par rapport aux bioessais
- niveau performances : si la surveillance des milieux biologiques par biocapteur est faisable, le milieu aquatique naturel présente des impondérables qui demandent une longue et délicate mise au point du biocapteur.

Dans ce contexte, les biorécepteurs moléculaires (enzymes et anticorps) sont défavorisés. Utiles pour détecter une molécule ou une famille de molécules en vertu de leur grande spécificité doublée d'une très bonne sensibilité, ils sont préconisés pour des mesures au laboratoire car leur stabilité est limitée et leur utilisation nécessite des réactifs appropriés au milieu et un contrôle pour éliminer les interférences susceptibles de modifier l'affinité pour le ligand.

D'autre part, les biorécepteurs moléculaires sont relativement coûteux à produire. L'étape d'extraction et la purification des enzymes doivent être poussées pour atteindre la sélectivité voulue. La mise au point de l'anticorps et sa production standardisée sont longues et requièrent une infrastructure spécialisée. Cet investissement lourd est envisageable seulement si la réglementation le nécessite. Enfin, leur immobilisation passe par des méthodes chimiques longues et parfois délicates à mettre en oeuvre.

Ainsi, les biorécepteurs cellulaires, plus résistants et faciles à immobiliser présentent-ils plus d'atouts pour détecter une toxicité globale du milieu *in situ* . Les biocapteurs à cellules entières sont plus simples à monter et à utiliser ; certes, leur sensibilité est moindre, mais ils donnent une information significative car ils donnent une réponse *in vivo* .

I.3. Bilan

Le test idéal devrait être simple, rapide, peu onéreux, sensible, reproductible et représentatif. Comme il n'existe pas, il est préconisé d'avoir recours à plusieurs méthodes faisant intervenir des éléments biologiques différents [Gaujous, 1994].

On tire ainsi profit de l'extrême diversité biologique et de sa capacité de réaction face à des produits naturels ou à des xénobiotiques. Les méthodes biologiques donnent une information sur la présence du toxique dans le milieu, sur son impact sur la matière vivante alors que les méthodes physico-chimiques identifient et dosent la fraction libre des molécules toxiques.

Les deux types de méthodes se complètent pour *le contrôle des milieux naturels* : les méthodes biologiques alertent sur la présence d'une substance indésirable et donnent une première information sur le type de molécule, les méthodes physico-chimiques posent alors le diagnostic. Dans le cas *du suivi écotoxicologique d'un effluent*, la molécule à contrôler est connue ; ici, les méthodes biologiques sont aussi intéressantes que les méthodes physico-chimiques car il s'agit de détecter un seuil de concentration aussi précisément que nécessaire (seuil défini dans le cahier des charges) et non pas aussi précisément que possible (référence à la sensibilité de la méthode).

Toutes les méthodes biologiques normalisées présentent des inconvénients (coût, lourdeur de la mise en oeuvre, limite d'applications) ; par exemple le test Microtox qui demeure le test de référence ne s'applique que si le produit à tester est soluble et stable dans la solution saline à 2 %, milieu de vie de *Photobacterium phosphoreum*, et la température doit être strictement fixée à 15°C.

Il convient donc de poursuivre les recherches pour optimiser ce qui existe et pour innover. Les deux voies, **bioessais et biocapteurs**, sont complémentaires ; il convient de tirer parti du meilleur de chacune : ainsi pour les mêmes outils impliqués, les biocapteurs sont souvent plus sensibles [Pandard et Vasseur, 1992], mais leur mise au point pour une installation *in situ* demande le concours de compétences pluridisciplinaires qu'il est difficile de réunir.

Les travaux évoqués ci-dessus et les besoins en analyse de l'eau nous conduisent à choisir **les micro-algues comme matériel d'étude**. Certes, leur emploi est déjà courant principalement pour les bioessais mais leur petite taille, leur autonomie de vie et leur place au sein des écosystèmes sont des atouts décisifs pour de nouveaux développements.

L'avenir prometteur des biocapteurs et l'expérience acquise dans ce domaine par le laboratoire nous amènent à **étudier la faisabilité de biocapteurs à micro-algues**. Néanmoins, les bioessais nous paraissent fort utiles ; aussi nous proposons-nous d'ouvrir des perspectives dans ce domaine par la mise en oeuvre de **nouvelles méthodes de laboratoire**.

II. PRODUITS ETUDIES

II.1. Les critères de sélection

La partie précédente (I, chap.1) a montré la diversité des produits testés. Cependant, avec des biorécepteurs végétaux, deux familles de molécules sont principalement détectées ; ce sont les triazines et les phénylurées. Le choix de ces herbicides repose sur la connaissance clairement établie de leur mécanisme d'action et sur une importante utilisation en culture céréalière.

Nos objectifs seront donc les suivants :

- **utiliser triazines et phénylurées** pour établir des comparaisons entre nos méthodes de détection et les travaux précédents

- **élargir le spectre des produits habituellement testés** sur les biorécepteurs végétaux, en particulier sur les micro-algues.

Les produits devront satisfaire à au moins un des **critères** suivants :

1°) être une molécule commune, à large diffusion

Le Round-up® (Monsanto), appellation commerciale du **glyphosate**, est largement épandu par les agriculteurs, les professionnels des espaces verts et le grand public.

Le **méthanol** est un solvant des graisses très utilisé dans l'industrie comme dans les laboratoires de synthèse et d'analyses. Pour les Etats-Unis, une utilisation annuelle de 500 000 tonnes est avancée [Howard, 1990].

2°) être une molécule relativement peu étudiée du point de vue de l'impact sur l'environnement ou du mécanisme d'action sur la matière vivante.

Citons l'**aminotriazole**, l'**alachlor**, le **méthanol**, le **paraquat**.

3°) être une molécule toxique pour laquelle existe une réglementation ou des recommandations des organismes compétents (OMS-CIRC).

Le **cadmium** et le **mercure** sont deux métaux lourds dont la présence dans l'environnement est réglementée, il en est de même pour les **dérivés chlorés du phénol**.

4°) être une molécule préoccupante par son effet sur l'environnement et pour laquelle, dans un avenir proche, une demande en analyse se développera.

Notre choix s'est porté sur le **perchloroéthylène**, un représentant des **composés organiques volatils** (COV).

Nous avons sélectionné douze molécules regroupées en trois catégories.

HERBICIDES		METEAUX LOURDS	SOLVANTS	
ATRAZINE	AMINOTRIAZOLE	CADMIUM (nitrate)	METHANOL	2-CHLOROPHENOL
DIURON	ALACHLOR	MERCURE (chlorure)		PERCHLOROETHYLENE
SIMAZINE	GLYPHOSATE PARAQUAT			

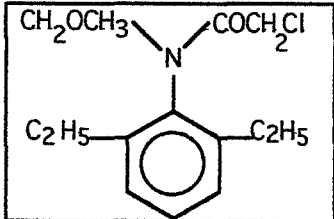
Tab. 10 : Les produits étudiés.

II.2. Données physico-chimiques

II.2.1. Caractéristiques des produits

Les propriétés physico-chimiques des principaux produits utilisés sont présentées dans des fiches signalétiques placées en annexe (**Annexe 1**). Ces informations proviennent principalement des fiches toxicologiques publiées par l'INRS [INRS, 97-a,b,c,e et 83, 84] et de l'index phytosanitaire [Acta, 1992].

Le 2-chlorophénol et l'alachlor servent de façon ponctuelle à l'expérimentation. Le 2-chlorophénol possède des propriétés voisines de celles du phénol dont il ne diffère que par une substitution [INRS, 1997-d]. Des informations concernant l'alachlor sont données dans le Tableau 11 [Acta, 1992].

<p>Chloro-2N-(diéthyl-2,6phényl)N-méthoxyméthyl acétamide</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -masse molaire = 269,7 g -densité = 1,13 dans l'eau à 25°C -solubilité = 240 mg.L⁻¹ dans l'eau à 25°C -hydrolysé à pH très acide et très alcalin -dosage par chromatographie phase gazeuse
---	---

Tab. 11 : Formule et propriétés de l'alachlor.

II.2.2. Protocole de préparation des solutions

En raison des caractéristiques chimiques des produits, notamment l'hydrosolubilité et la volatilité, des précautions d'emploi s'imposent. Certaines molécules sont peu solubles dans l'eau comme les triazines. Les solutions-mères sont préparées dans l'eau Milli-Q® (Millipore) sous forte agitation avec recours si nécessaire à la solubilisation par ultra-sons.

Pour des essais ponctuels à très faibles concentrations, de l'ordre de la nano-mole, les solutions-mères sont solubilisées dans l'eau contenant 1% (v/v) de méthanol.

Les solutions initiales sont maintenues à l'obscurité et à 4°C, au maximum 7 jours sauf pour les produits volatils ; les solutions-mères des solvants sont préparées juste avant utilisation dans des flacons hermétiques dont la contenance est adaptée à la phase liquide utile afin de limiter les pertes par vaporisation.

Avant l'expérimentation, le pH des solutions-mères, leurs spectres d'absorption et de fluorescence dans le domaine visible sont contrôlés.

Toutes les solutions test sont obtenues par dilution dans l'eau Milli-Q[®] *ex tempore*.

II.2.3. Origine des produits

Tous les herbicides ainsi que le chlorophénol appartiennent à la gamme Pestanal[®], gamme des pesticides ultra-purs pour l'analyse des résidus fournis par Riedel-de-Haën.

Le perchloroéthylène de grade spectrophotométrique et le méthanol de grade analytique proviennent de Janssen Chimica.

Les sels des métaux lourds de qualité analytique sont fournis par Prolabo.

II.3. Données toxicologiques et écotoxicologiques

II.3.1. Les herbicides

La présentation de ces molécules repose sur leur mécanisme d'action [Scalla, 1991].

♦ *Le diuron*, représentant des phénylurées, et les triazines retenues, *atrazine* et *simazine* ont une cible sur la matière végétale assez précisément élucidée. Les trois produits se fixent sur une molécule de la chaîne redox photosynthétique ; ils bloquent ainsi une étape précoce de la photosynthèse qui est le métabolisme vital des végétaux. La photosynthèse sera étudiée dans le chapitre 2 (I.4.1, chap.2).

Cités comme peu toxiques pour la faune [Acta, 1992], le diuron est pourtant interdit sur certains végétaux et l'atrazine est considérée comme un xénoestrogène, substance qui potentialise les effets des œstrogènes chez les animaux et qui déclencherait des cancers [Davis et Bradlov, 1995]. Enfin, les deux triazines font l'objet d'une réglementation sur le plan sanitaire.

♦ *Le paraquat* est un représentant des bipyridyles ; il agit également sur la chaîne photosynthétique mais plus en aval (I.4.2.4, chap.2).

Les conséquences métaboliques du paraquat sont multiples : à l'inactivation progressive du système de transfert d'électrons photosynthétiques s'ajoutent une augmentation

de la perméabilité cellulaire vis-à-vis des ions et des dégradations au niveau des structures membranaires par peroxydation des lipides ; les glycolipides, les phospholipides, les sphingolipides sont particulièrement touchés. Le mécanisme est le suivant : déshydrogénation d'une molécule d'acide gras dont la liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'hydrogène est aisée à rompre. L'attaque par une molécule d'oxygène provoque l'apparition de deux types de radicaux (ROO^* , RO^*). Ces derniers sont convertis en hydroperoxydes et subissent des fragmentations spontanées faisant apparaître des composés qui pourraient perpétuer l'agression radicalaire. Les protéines voisines incluses dans l'architecture lipidique membranaire sont endommagées car leur stabilité est réduite en fonction du degré d'insaturation des acides gras [Fournier, 1993].

Contre ces dangers radicalaires, les cellules disposent de moyens de défense : pièges à radicaux, enzymes (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase (SOD)). Cette dernière, la SOD présente dans les chloroplastes a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*. Le brevet des laboratoires Payot (1995) établit que des extraits d'algues, dont les *Chlorella*, sont riches en composés anti-radicalaires utilisables en cosmétologie. Si les radicaux oxygénés activent bien la SOD, il n'en demeure pas moins que la SOD ne suffit pas à la détoxification. Une accumulation de composés instables conduit donc à des réarrangements des molécules détériorées au sein des membranes désorganisées, ce qui expose davantage les pigments aux agents oxydants [Sgherri et al., 1993].

Le matériel génétique (ADN) constitue aussi une cible privilégiée des espèces radicalaires [Sgherri et al., 1993].

Le paraquat est un produit dangereux pour la faune, il existe des quantités limitées à respecter lors des pulvérisations ; chez l'homme, il provoque des dermatoses, une fibrose pulmonaire et des atteintes digestives et rénales.

♦ *Le glyphosate*, organo-phosphoré, possède une cible clairement identifiée. Chez les végétaux, il serait un inhibiteur d'une enzyme du chloroplaste intervenant dans la synthèse de certaines protéines. Les perturbations induites sont un ralentissement de la croissance et une diminution de la teneur en chlorophylles.

Le produit semble peu dangereux pour l'environnement, il n'est pas répertorié dans les livres de toxicologie cités.

♦ *L'aminotriazole* ralentit la croissance végétale et surtout empêche la formation des pigments. Les caroténoïdes sont affectés principalement. Comme ils protègent les chlorophylles de la photo-oxydation, l'aminotriazole a une action indirecte sur ces pigments essentiels. Cet herbicide est aussi toxique sur des cellules végétales ne contenant pas de pigment, il existerait donc d'autres actions mal connues. Chez l'homme, on observe une incidence sur la thyroïde.

♦ *L'alachlor* représentant de la famille des chloroacétamides freine à la fois les divisions et l'élongation cellulaires. La synthèse des protéines est un des premiers processus biochimiques à être inhibé mais la synthèse des lipides serait aussi ralentie. Hormis dans la sphère végétale, nous n'avons pas trouvé des effets de son impact sur l'environnement.

II.3.2. Les métaux lourds

De façon générale, les métaux lourds sont des éléments naturels, dispersés dans les roches, le sol, l'eau, l'air. L'eau douce peut contenir jusqu'à 1 µg de cadmium par litre sans que cela soit anormal [Haguenoer et Furon, 1981].

A cela s'ajoutent les rejets provenant des activités humaines. Le mercure (Hg) provient de l'utilisation des énergies fossiles, de l'incinération de déchets des fonderies, de la fabrication d'équipements électriques et des amalgames dentaires, de l'industrie de la pâte à papier sans oublier l'activité agricole [INRS, 1997-b]. Le cadmium (Cd) est un revêtement anti-corrosion des métaux, il entre dans la constitution des nombreux alliages, enfin il sert de stabilisant pour plastiques [INRS, 1997-a].

La principale caractéristique des métaux lourds est d'être stable après émission dans l'environnement ; n'étant pas dégradés, ils sont présents dans l'air, dans l'eau de surface, dans les nappes phréatiques et se déposent sur la végétation, donc s'accumulent dans la chaîne alimentaire. Les facteurs de bioaccumulation dans les espèces animales peuvent atteindre des facteurs 10 000 pour le mercure sous forme méthyle et jusqu'à 100 000 pour le cadmium.

En raison de ce comportement, une réglementation existe pour l'eau destinée à la consommation humaine, cadmium et mercure sont également dosés dans l'air par les centres pilotes urbains.

Deux accidents tristement célèbres rappellent les dangers pour l'homme, celui de la baie de Minamata au Japon contaminée par le mercure et l'itaï-itaï, maladie affectant des populations japonnaises dans laquelle le cadmium est incriminé [Lu, 1992].

Les portes principales d'entrée dans l'organisme sont les poumons et le tractus gastro-intestinal [Descotes et al., 1992]. Les cibles sont variés :

- Hg : incidence respiratoire, digestive, nerveuse, dermatologique
- Cd : incidence hépatique, rénale, et sur la reproduction.

Au niveau moléculaire, mercure et cadmium ont une forte affinité pour les ligands de type soufrés et azotés ; dans les cellules, ce sont donc protéines, ADN mais aussi lipides qui sont touchés.

♦ *Atteinte des protéines*

Les cibles privilégiées sur les protéines sont les groupements thiol : -SH, disulfure : -S - S -, thioether : -SR, amine : -NH₂.

L'altération des enzymes protéiques a des effets négatifs sur le métabolisme respiratoire et sur la photosynthèse. L'inhibition des phénomènes redox de la photosynthèse a été observée sur plusieurs éléments végétaux, des chloroplastes [Purcell et Carpentier, 1990], des micro-algues [Clijsters et Van Assche, 1990]. Les CI_{50} sont de l'ordre de 1 mg.L^{-1} .

Il est à noter qu'un des mécanismes de détoxification mis en jeu par divers organismes est la synthèse d'une protéine riche en groupements thiol : la métallothionéine capable de fixer, entre autres, Hg et Cd.

♦ Atteinte du matériel génétique

Le mercure cause des dommages à l'ADN *in vitro* en se complexant sur l'azote des bases des nucléotides. Les mercuriels ont des actions variées, la forme organique dénature la double hélice alors que les ions Hg^{2+} forme des associations réversibles avec les bases. On a mis en évidence des lésions chromosomiques lors des divisions cellulaires.

Les composés du Cd induisent des coupures de monobrans d'ADN [Hartwig, 1994].

♦ Atteinte des membranes cellulaires

Elles sont constituées de protéines associées à des lipides.

Des levures observées en microscopie montrent une altération structurale de leur membrane plasmique [Molegnana, 1993]. Cette membrane représente une cible importante car elle assure, avec la paroi, la régulation des échanges de la cellule avec le milieu. De nombreux auteurs ont constaté des modifications de la perméabilité sous l'action des métaux lourds : le mercure entraîne une fuite d'un ion essentiel, le potassium, alors que le cadmium agirait sur le flux de calcium par inhibition de l'ATPase membranaire [Jeanne et al., 1993].

♦ Action sur la croissance cellulaire

Des études réalisées sur la micro-algue *Scenedesmus* montrent qu'après trois jours d'incubation

- la CI_{50} est de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour le cadmium [Nielsen et Hougaard, 1993]
- la CI_{50} est de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le mercure [Fargosova, 1993].

II.3.3. Les solvants

Méthanol et perchloroéthylène sont bien connus du grand public, les dérivés du phénol ont un usage plus spécifique.

♦ Le méthanol a des usages divers : solvant, agent de synthèse, métabolite.

Sur le plan toxicologique, il altère la vision et agit sur le système nerveux [Lu, 1992].

Ce solvant agit sur la pression osmotique des cellules du fait de sa grande hydrophilie, il fonctionnerait aussi comme piège à radicaux OH^{\bullet} , mais aurait tout de même une toxicité propre vis-à-vis des lipides membranaires [Fournier, 1993].

Le méthanol est couramment utilisé pour solubiliser les pigments des végétaux.

Il est présent dans l'air, très miscible à l'eau, il migre facilement dans les sols [Howard, 1990].

♦ Le *perchloroéthylène* est un solvant chloré qui entre dans la catégorie des COV.

L'arrêté ministériel du 1/3/93 les définit ainsi : *Tous composés à l'exclusion du méthane contenant du carbone et de l'hydrogène, ce dernier pouvant être partiellement ou totalement substitué par d'autres atomes (halogènes, oxygène, soufre, phosphore, azote) à l'exception des oxydes de carbone et des carbonates dans les conditions de fonctionnement de l'installation.*

Le projet de directive européenne, version du 01/04/96 précise que les COV sont tous des composés organiques ayant une pression de vapeur saturante supérieure ou égale à 0,01 kPa à 293° K ou de volatilité équivalente dans les conditions d'utilisation [Dueso, 1997].

Les COV chlorés sont des polluants directs par leur action sur la santé humaine, indirects par leur contribution aux réactions photochimiques dans la basse atmosphère et le renforcement de l'effet de serre [Ineris, 1995].

Naturellement peu abondants les solvants chlorés proviennent des activités humaines, petites industries et particuliers, de sorte qu'on observe de nombreux rejets diffus. Leur utilisation est importante : 85 000 tonnes par an pour le dégraissage des métaux et le nettoyage à sec, dont 17 000 tonnes par an de perchloroéthylène [Dueso, 1997].

Le perchloroéthylène est présent dans l'eau, l'air et le sol ; du fait de ses propriétés chimiques, il est peu labile :

- s'échange entre l'eau - l'air par volatilisation et déposition
- évolue peu dans un milieu par hydro- ou photolyse
- s'adsorbe sur les particules dans les sols, migre et ainsi se retrouve dans les nappes profondes où il séjourne en raison de sa densité [Etude Inter Agences, 1993].

Le perchloroéthylène est nocif pour la peau et les muqueuses respiratoires, déprimeur pour le système nerveux et soupçonné d'être cancérogène. Du fait de sa lipophilie, il est bioaccumulé et a été retrouvé dans les aliments. Une réglementation existe pour l'atmosphère des ateliers et pour les rejets industriels dans les rivières.

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude du mécanisme d'action du perchloroéthylène sur la matière vivante plus précis que la solubilisation des acides gras.

♦ Les *dérivés chlorés du phénol* sont aussi des COV. En fonction du nombre d'atomes de chlore substitués, ces composés sont utilisés de façon spécifique dans le domaine médical mais surtout dans divers domaines industriels (métallurgie, fabrication de pesticides, industrie du bois, papeteries) [Gaujous, 1994].

Les dérivés chlorés du phénol sont soumis à une réglementation car dangereux pour le milieu et la matière vivante. Les études chez l'animal montrent qu'ils sont mutagènes mais

non cancérigènes. Chez l'homme, ces molécules sont toxiques par voie cutanée, l'inhalation a des répercussions à différents niveaux (respiratoire, digestif, cardio-vasculaire et rénal).

A l'échelle cellulaire, ce sont des poisons de la respiration par effet découplant entre activité ATPasique et transfert électronique dans le métabolisme oxydatif. Comme l'ATPase existe aussi dans les chloroplastes, ils perturbent la photosynthèse. Shigeoka (1988) a montré sur des cultures de chlorelles que l'effet des dérivés chlorés du phénol dépend du nombre d'atomes de chlore. La CI_{50} pour l'inhibition de la croissance à 96 heures est de 170 mg.L^{-1} pour le 2-chlorophénol et de 10 mg.L^{-1} pour le 2,4,6-chlorophénol.

II.4. Réglementation et recommandations

Nous donnons à titre indicatif des extraits de la réglementation. Celle-ci est très complexe et en évolution constante. Les indications légales et les recommandations d'organismes compétents tels que l'OMS et le CIRC ne sont pas toujours cohérentes ; des voix se sont élevées pour dénoncer l'exigence du législateur qui rend difficile l'application de la loi sur le terrain. "Cette stratégie débouche sur l'illusion d'une fausse sécurité. Elle entraîne des dépenses considérables et des difficultés analytiques majeures, compte-tenu des limites de détection envisagées. Il faut ajouter qu'à ces limites de concentrations ($\mu\text{g/l}$ ou fractions de $\mu\text{g/l}$) l'eau n'est pas un produit pur. L'expérience montre qu'elle contient une multitude de "contaminants" pratiquement inconnus, ce qui se traduit par un "bruit de fond" très important, dans lequel, en définitive la présence de quelques produits phytosanitaires aux concentrations envisagées peut apparaître comme mineure... Une norme analytique doit être considérée comme un objectif de qualité et non pas comme un objectif de salubrité" [Rico, 1995].

Le classement européen (arrêté du 1/04/89) qui fixe les conditions d'étiquetage et d'emballage des substances dangereuses indique que le mercure est *très toxique*, le paraquat et le méthanol sont *toxiques*, le diuron *irritant* et les autres molécules sont *nocives*. Le 2-chlorophénol et la simazine sont répertoriés très toxiques pour l'environnement aquatique et l'atrazine toxique [JO, 1993].

Le décret relatif aux eaux destinées à la consommation (modifications du 1/04/90 et du 7/03/91) limite la présence de [JO, 1991] :

- cadmium dissous à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$
- mercure dissous à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$
- atrazine à $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$

alors que l'OMS préconise pour l'atrazine $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ mais recommande de limiter la teneur en simazine à $17 \mu\text{g.L}^{-1}$ et en perchloréthylène à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ [Galal-Gorchev et al., 1993].

La réglementation européenne et le CIRC ont établi une liste des substances cancérogènes pour l'homme :

- le cadmium appartient au groupe 2A, cancérogène probable pour l'homme.
- l'aminotriazole, l'atrazine, le perchloroéthylène, le chlorophénol sont dans le groupe 2B, cancérogène possible pour l'homme d'après le CIRC [Picot et al., 1993] alors que la fiche réglementaire européenne [INRS, 1997-f] place dans la catégorie 3, celle des substances préoccupantes, l'alachlor, l'aminotriazole, l'atrazine, le perchloréthylène et la simazine.

Il existe par ailleurs des obligations sur les rejets industriels contenant du mercure, du cadmium, du perchloroéthylène ou du méthanol [JO, 1993].

Enfin, les atmosphères des ateliers doivent être contrôlées ; la valeur limite de moyenne d'exposition (VME) autorisée pour :

- le mercure est de 0,1 ppm
- le méthanol est de 200 ppm
- le perchloroéthylène est de 50 ppm [INRS, b,c,e].

II.5. Conclusion

Les molécules sélectionnées appartiennent aux trois catégories de produits qui posent aujourd'hui des problèmes graves de pollution.

Pour toutes ces molécules, les méthodes biotechnologiques de détection et de dosage sont à rechercher ou à perfectionner.

L'étude sera conduite avec deux idées directrices :

- évaluer l'impact de l'exposition des cellules végétales à ces produits par différentes méthodes d'analyse,
- discuter la faisabilité d'un système d'alerte à la pollution par biocapteur et d'un système de dosage.

L'objectif pourra être aussi plus fondamental via le mécanisme d'action du produit.

CHAPITRE 2

LES CHLORELLES

CHAPITRE 2

LES CHLORELLES

Les chlorelles sont des micro-algues des eaux douces.

I - BIOLOGIE DES CHLORELLES

Dans cette partie, nous justifions le choix de *Chlorella vulgaris* comme biorécepteur. La photosynthèse, phénomène vital des micro-algues, est présentée dans la perspective de l'utilisation analytique de ces végétaux. Les thylakoïdes, éléments sub-cellulaires, support fonctionnel de la photosynthèse, sont décrits.

II - CULTURE DES CHLORELLES

Les chlorelles sont cultivées au laboratoire, nous donnons les caractéristiques de leur croissance.

III - IMMOBILISATION DES CHLORELLES

La méthode d'immobilisation que nous avons mise au point pour l'intégration des micro-algues dans un biocapteur est exposée.

I. BIOLOGIE DES CHLORELLES

Les micro-algues désignent l'ensemble des micro-organismes eucaryotes photosynthétiques ainsi que les cyanoprocaryotes. C'est un groupe diversifié comptant 25 000 espèces dont une cinquantaine est étudiée en détail en raison de leurs utilisations biotechnologiques.

I.1. Utilisation biotechnologique des micro-algues

L'exploitation industrielle des micro-algues concerne différents domaines (Fig. 2).

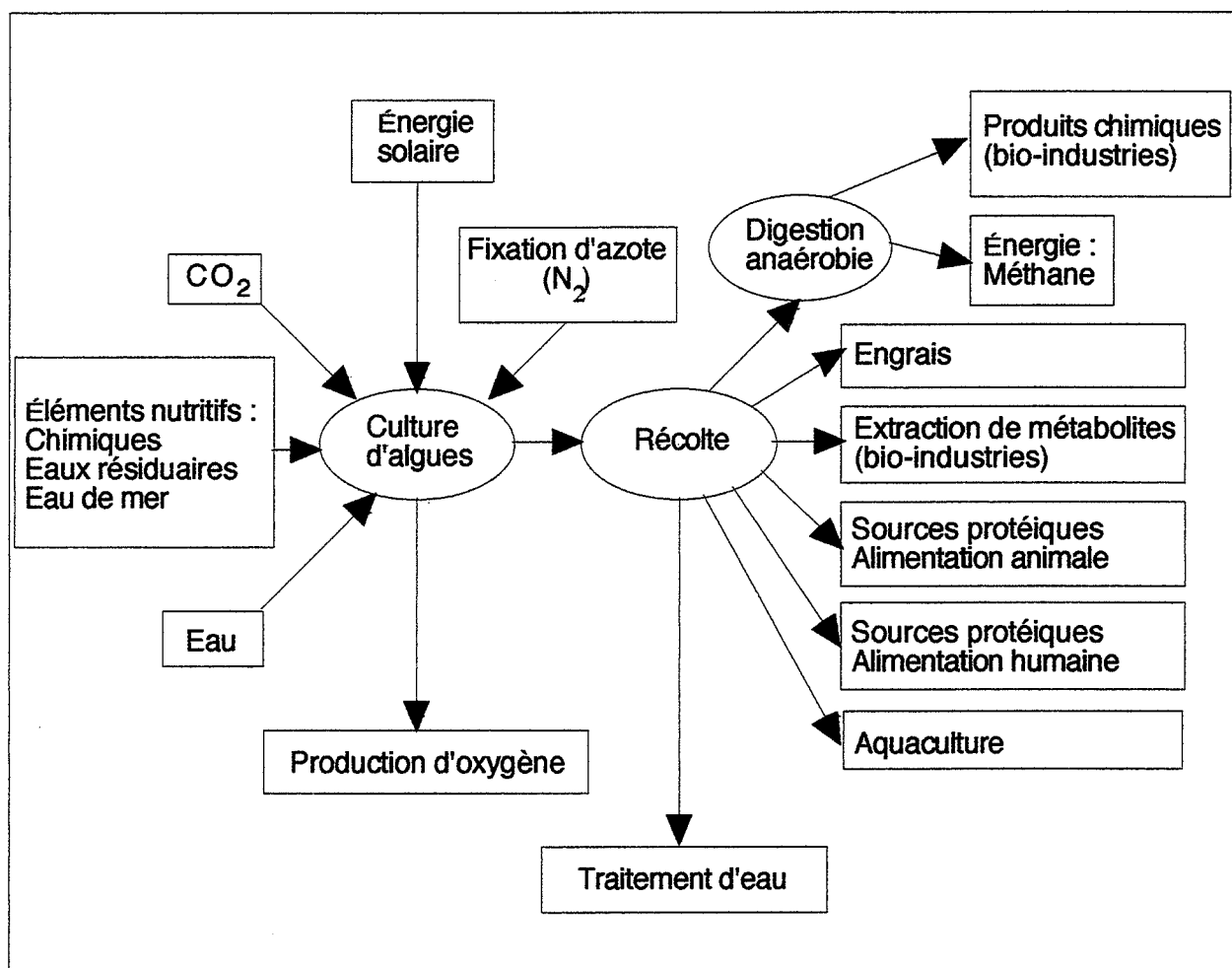


Fig. 2 : Les domaines d'application industrielle des micro-algues [Callegari, 1989-a].

L'utilisation des micro-algues dans le secteur de l'alimentation animale et humaine représente un intérêt considérable du point de vue économique et nutritionnel. Outre leur richesse en acides aminés et protéines, les algues vertes et les cyanoprocaryotes fournissent des lipides, des vitamines hydrosolubles - C, E -, des colorants, alors que les algues rouges

produisent des polysaccharides utilisés comme agent de viscosité ; enfin, les algues brunes apportent leur contribution à la complémentation alimentaire.

Après extraction des produits économiquement intéressants, la biomasse algale peut être convertie par fermentation en méthane ou alcool.

D'autres utilisations en pharmacologie et en cosmétologie sont en voie de développement.

Dans le domaine de l'environnement, les micro-algues interviennent dans :

- le traitement des eaux résiduelles urbaines via l'apport d'oxygène photosynthétique
- la dépollution des milieux par bioaccumulation péricellulaire des métaux ou biodégradation des hydrocarbures
- la détection des polluants des eaux et des effluents.

1.2. Choix motivé de *Chlorella vulgaris*

Nous avons précédemment justifié notre intention de travailler avec des micro-algues (I, chap.1). Nous choisissons des micro-algues unicellulaires vertes pour des raisons pratiques : identification taxonomique aisée et maintenance facile des cultures en laboratoire.

En effet, ces deux critères ne sont pas caractéristiques des autres groupes d'algues. Les cyanoprocaryotes sont certes utilisés dans les méthodes de détection des toxiques mais ce groupe présente des potentialités adaptatives telles que les individus pourraient supporter des taux de xénobiotiques non représentatifs de l'ensemble du monde vivant [Tandeau de Marsac, 1993]. Ils possèdent souvent une paroi mucilagineuse absorbante et accumulatrice. Certains auteurs observent par induction de toxique une évolution morphologique, par exemple, chez *Nostoc* passage des formes filamenteuses à des formes unicellulaires sous l'action de gardoprim [Abou-Waly, 1991].

Parmi les algues vertes étudiées par les biologistes, trois espèces sont très communes dans les laboratoires d'écotoxicologie ; ce sont *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* et *Chlorella vulgaris*.

Les deux premières espèces sont impliquées dans des tests normalisés d'écotoxicité.

Nous avons donc choisi d'apporter notre contribution à l'étude de *Chlorella vulgaris*. De plus, la forme, ronde et lisse, et l'absence d'organe locomoteur sont des avantages lors des applications microscopiques.

Chlorella vulgaris est un organisme dont la position taxonomique est la suivante :

- phylum : Chlorophytes
- embranchement : Chlorophycophytes
- classe : Chlorophycées
- sous-classe : Chlorophycidées
- ordre : Chlorococcales.

La souche axénique - CCAP 211/12 - provient de l'algothèque de "Institute of Freshwater Ecology, The Windermere Laboratory Far Sawrey, Ambleside, Cumbria LA22 OLP, UK".

1.3. Présentation de *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris désigne une algue unicellulaire, immobile et globulaire, de taille moyenne estimée à 4 μm . En fait, cette appellation regroupe divers clones morphologiquement et physiologiquement proches.

La souche choisie est une forme solitaire, excepté lors de la reproduction. La reproduction asexuée se caractérise par la non-séparation des cellules filles au stade 2 ; en fin de 2^{ème} division, la paroi initiale se déchire libérant les 4 autospores.

A l'intérieur de la cellule, on distingue aisément un chloroplaste qui représente environ à 50 % du volume intracellulaire, par contre le noyau est petit.

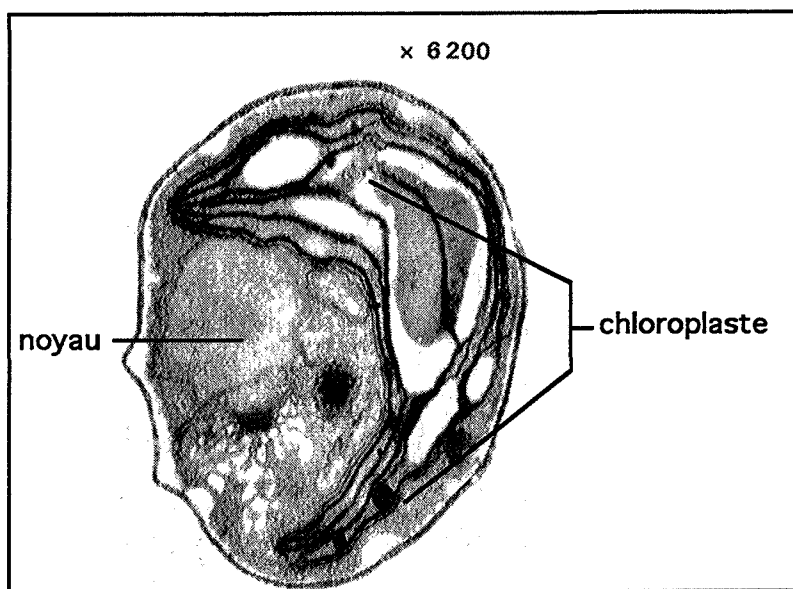


Fig. 3 : *Chlorella vulgaris*, vue en MET (x 6200).

La cellule est entourée d'une paroi lisse comportant une charpente cellulosique doublée d'une couche de sporopollénine [Dodge, 1973] ; la résistance conférée par ce composant, d'ailleurs très répandu dans le règne végétal, n'est pas rédhibitoire car l'objectif est d'étudier les capacités bio-indicatrices de la micro-algue et non de détecter à des niveaux très bas tel ou tel produit.

L'inventaire algistique de nos rivières et lacs ne comporte pas systématiquement les chlorelles, elles sont surtout présentes au bloom estival ou dans certaines conditions comme dans les eaux chargées en matières organiques [Gaujous, 1994]. En revanche, ce sont des

algues ubiquistes, elles sont donc répertoriées et disponibles dans plusieurs algothèques et laboratoires internationaux. De plus, elles sont bien connues des physiologistes qui les ont utilisées pour l'étude de la photosynthèse.

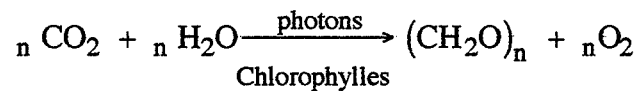
Enfin, soulignons la diversité écologique des clones de *Chlorella vulgaris*. La plupart est dulçaquicole mais certains clones montrent une adaptation aux eaux salines, d'autres résistent à la déshydratation de telle sorte que *Chlorella vulgaris* est aussi présente en milieu marin et en milieu aérien (développement dans le sol) [Bacq-Calberg et al., 1990].

1.4. Aspect de la physiologie des micro-algues

1.4.1. Activité photosynthétique

Les algues sont le pivot des écosystèmes aquatiques en tant que producteurs primaires grâce à leur capacité photosynthétique.

Les pigments chlorophylliens des algues captent l'énergie solaire, les cellules la convertissent en énergie chimique et l'utilisent pour synthétiser des molécules organiques à partir de matière minérale :



Cette réaction globale résume un métabolisme complexe qui se déroule en deux phases dans les chloroplastes. La Figure 4 rappelle la compartimentation de ces organites qui est à relier à leur mode de fonctionnement [Berkaloff et al., 1981].

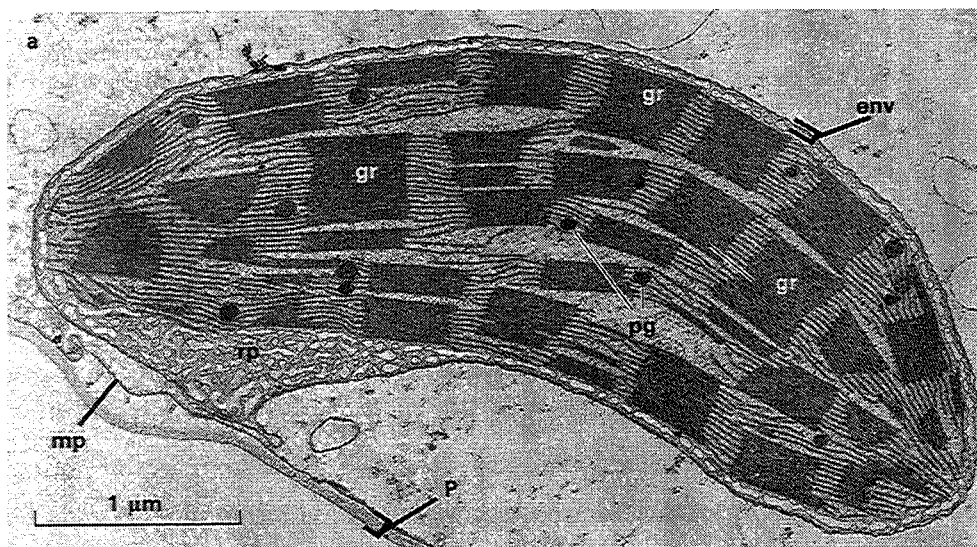


Fig 4 : Organisation structurale du chloroplaste.

éléments du chloroplaste
gr: empilement de thylakoïdes
pg: plastoglobule
env: double membrane

éléments de la cellule
mp: membrane plasmique
rp: réticulum périphérique
p: paroi cellulaire

♦ *La phase lumineuse* débute par l'absorption de photons, initiatrice de réactions d'oxydo-réduction et aboutit à la formation de composés à haut pouvoir réducteur (NADPH^{*}) et énergétiques (ATP). Elle se déroule dans les thylakoïdes.

♦ *La phase sombre* utilise les produits ainsi formés pour réduire le carbone minéral en carbone organique dans l'espace stromatique situé entre les thylakoïdes.

Dans le cadre de notre étude, seule la phase lumineuse nous intéresse.

1.4.2. Organisation fonctionnelle des thylakoïdes

Les thylakoïdes se présentent sous forme de saccules aplatis limités par une membrane.

L'architecture moléculaire de la membrane des thylakoïdes est analogue à la structure membranaire classique. La structure générale est une bicouche de lipides amphiphiles auxquels sont associées des protéines.

L'analyse chimique révèle que les membranes des thylakoïdes sont composées de 50 % de protéines, de 38 % de lipides et de 12 % de pigments [Berkaloff et al., 1981].

1.4.2.1. Lipides et protéines

La moitié des lipides appartient à la famille des galactolipides dont les acides gras sont de type insaturé. On trouve également des phospholipides et des sulfolipides.

Dans les thylakoïdes, les protéines sont essentiellement hydrophobes. Elles sont classées en trois groupes fonctionnels :

- complexes protéines-chlorophylle
- constituants de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons
- ATPases.

Chez les algues vertes, la plupart des molécules de chlorophylle est engagée dans ces complexes nommés light-harvesting chlorophyll protein complex (LHC). L'aspect fonctionnel des LHC est très dépendant de l'architecture membranaire. Il a été démontré que la stabilisation des LHC est soumise à l'interaction hautement spécifique avec un lipide de la membrane, le phosphatidylglycérol [Tremolières, 1998].

Les constituants de la chaîne photosynthétique sont des transporteurs d'électrons catalysant les réactions d'oxydo-réduction. Les métalloprotéines transportent uniquement des électrons. Les plus connues sont les cytochromes *f* et *b₆*, la ferrédoxine et la plastocyanine. Il existe également des transporteurs d'électrons et de protons : la plastoquinone et la ferrédoxine-NADP^{*} réductase. Tous les transporteurs d'électrons sont caractérisés par leur potentiel standard d'oxydo-réduction (E'_0).

L'ATPase chloroplastique est un complexe protéique qui comporte deux parties : une partie catalytique hydrosoluble et une partie hydrophobe intégrée aux lipides membranaires qui constitue un canal à protons.

1.4.2.2. Les pigments

On trouve deux types de pigments : les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune ou orange. Ce sont les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont de longues molécules formées d'unités isoprène dont les extrémités sont cyclisées. Le β -carotène est le représentant le plus abondant. Les xanthophylles sont des dérivés oxygénés des carotènes.

Les chlorophylles sont des complexes porphyrine-magnésium. Chez les algues certes existent deux types de chlorophylles qui diffèrent l'un de l'autre par un groupement situé en position 3 sur le noyau de la porphyrine : un méthyle pour la chlorophylle *a* et un formyle pour la chlorophylle *b*.

Les chlorophylles absorbent l'énergie lumineuse grâce aux doubles liaisons conjuguées du noyau tétrapyrrolique de la porphyrine. Cette propriété permet de doser la chlorophylle [Arnon, 1949].

1.4.2.3. Les photosystèmes

Les pigments sont regroupés en amas de plusieurs centaines d'unités appelés antennes. Chacune fonctionne comme un entonnoir, elle collecte l'énergie lumineuse et la dirige sur un centre réactionnel formé de molécules de chlorophylles *a* entourées d'un donneur et d'un accepteur d'électrons. Le photosystème désigne l'ensemble constitué par l'antenne et le centre réactionnel, il représente une unité fonctionnelle.

On distingue deux photosystèmes nommés photosystème I (PS I) et photosystème II (PS II), en fonction des spectres d'absorption des chlorophylles *a*. Bien que chimiquement identiques, ces molécules absorbent différemment dans le visible car leur environnement protéique n'est pas le même. Le centre réactionnel du PS I absorbe de façon maximale à 700 nm, celui du PS II à 680 nm [Weil, 1990].

1.4.2.4. Le fonctionnement du photosystème II

Au sein de l'antenne, l'énergie lumineuse absorbée par les différentes molécules pigmentaires est transférée par résonance sur les molécules de chlorophylle *a* du centre réactionnel. Ces réactions sont très rapides (quelques nano-secondes) et requièrent une organisation structurale très précise. Ainsi distingue-t-on les chlorophylles du centre réactionnel des autres molécules de chlorophylles qui ne réalisent que l'absorption et le transfert d'énergie.

Au sein du centre réactionnel, les chlorophylles du PS II ayant absorbé un photon sont dans un état excité instable. Une réaction photochimique a lieu permettant le déplacement d'un

électron de la molécule excitée vers l'accepteur primaire (une phéophytine) puis sur les quinones Q_A et Q_B . Ces différents éléments sont associés à des protéines au sein d'un complexe multimoléculaire. Q_B est le site de fixation des triazines et du diuron.

Les électrons déplacés sur Q_B sont ensuite transportés par un ensemble de plastoquinones (PQ) libres dans la phase lipidique de la membrane du thylakoïde vers un second complexe membranaire associant une protéine soufrée et le cytochrome f. La plastocyanine est le dernier accepteur d'électrons côté PS II, elle se trouve en déficit électronique en tant que donneur d'électrons du PS I.

Le transfert d'électrons se termine à l'arrivée sur le dernier accepteur côté PS I, le $NADP^+$ qui peut entrer en compétition avec le paraquat. Le retour à l'état initial des chlorophylles du centre réactionnel du PS II est assuré par l'oxydation de l'eau au cours de laquelle les électrons libérés passent par un intermédiaire comportant du manganèse.

L'énergie dissipée lors de ce transport d'électrons permet l'établissement d'un gradient transmembranaire de protons qui sera utilisé pour la synthèse de l'ATP par un complexe protéique associant l'ATPase.

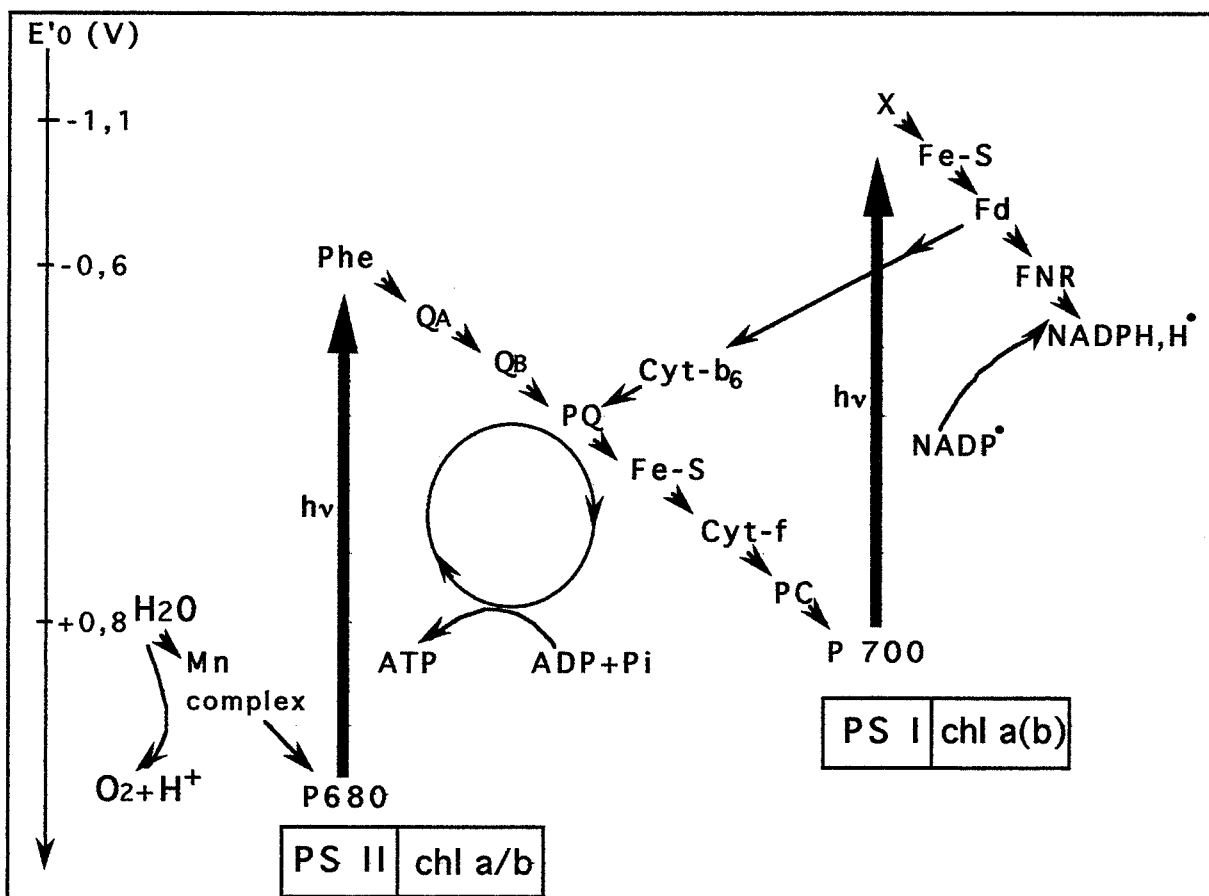


Fig.5 : Schéma du transport d'électrons lors de la photosynthèse.

PS I, PS II : photosystèmes I, II ; chl : chlorophylle ; P 680, P 700 : chlorophylles des centres réactionnels PS II, PS I ; Ph : phéophytine. Q_A , Q_B : quinones A, B ; PQ : plastoquinones ; Cyt-f, Cyt- b_6 : cytochromes f, b_6 ; Fe-S : protéines fer-soufre ; PC : plastocyanine ; X : accepteur primaire du photosystème I ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine-NADP réductase.

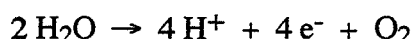
1.4.3. Les traceurs de l'activité photosynthétique

La production d'oxygène et la fluorescence de la chlorophylle *a* sont deux marqueurs remarquables de l'activité photosynthétique.

Ces deux phénomènes sont, en effet, associés intimement aux réactions décrites précédemment (1.4.2.4, chap.2).

1.4.3.1. La production d'oxygène

La production d'oxygène provient de la photolyse de l'eau.



Avec un potentiel redox élevé (+ 0,75 V), l'eau sert de donneur d'électrons pour réduire le PS II via un accepteur intermédiaire. Les protons libérés alimentent le flux transmembranaire nécessaire au fonctionnement de l'ATPase.

La mesure de la production d'oxygène est couramment utilisée pour évaluer l'activité photosynthétique au niveau des photosystèmes car elle est représentative de leur état fonctionnel et la mesure est simple puisqu'il s'agit de doser le dégagement d'un gaz dans le milieu (I, chap.1).

De nombreuses techniques sont utilisées pour déterminer les teneurs en oxygène dissous dans les milieux aqueux, qu'il s'agisse de méthodes chimiques, optiques ou électrochimiques. Les méthodes électrochimiques, en particulier ampérométriques, sont les plus fréquemment rencontrées. Elles se caractérisent par l'application d'une source de tension extérieure qui force la réduction de l'oxygène par imposition d'un potentiel suffisant à la cathode (électrode de platine). L'anode est en Ag/AgCl comme l'a décrit Clark (1962). Une membrane hydrophobe sélective à l'oxygène gazeux permet la diffusion du gaz vers la cathode en évitant l'interférence des espèces électroactives présentes dans le milieu.

L'électrode de Clark est très utilisée, elle peut être miniaturisée. C'est la méthode de mesure que nous utiliserons, elle permet de travailler en milieu aqueux et aussi en atmosphère humide.

1.4.3.2. La fluorescence chlorophyllienne

Les pigments intervenant dans la photosynthèse sont des molécules fluorescentes. Le principe de la fluorescence moléculaire est rappelé en annexe (**Annexe 2**).

L'énergie d'excitation accumulée par l'antenne collectrice passe des molécules pigmentaires (chlorophylle *b*, xanthophylles, carotène) aux molécules de chlorophylles *a* par résonance en des temps très brefs de l'ordre de la nano-seconde [Krause et Weiss, 1991 ; Karukstis, 1992].

Le centre réactionnel se trouve alors dans un état excité, très instable. La séparation de charges qui initie les réactions redox au sein de la chaîne photosynthétique s'accompagne de pertes sous forme de chaleur et sous forme de fluorescence (Figure 6).

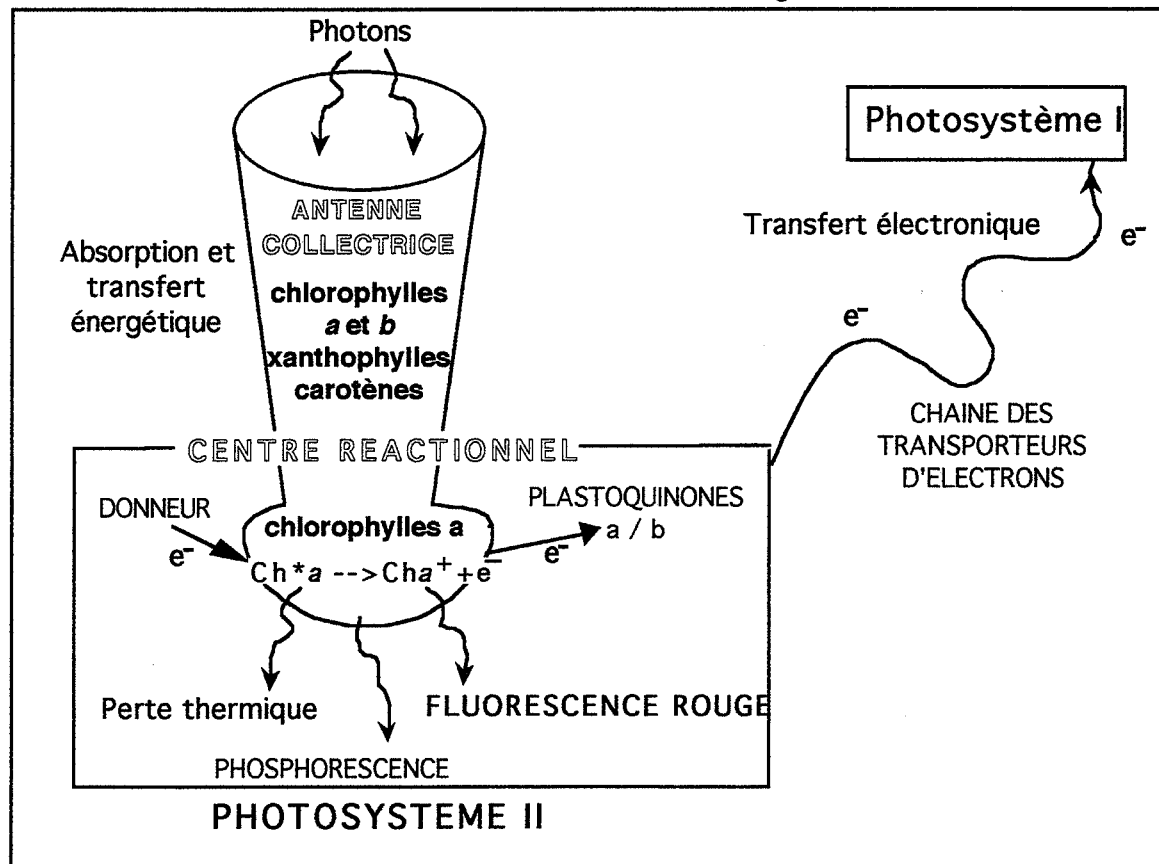


Fig 6 : Réactions chimiques et physiques au sein du PS II.

A température ambiante, on peut seulement mesurer la fluorescence du PS II. C'est un phénomène précoce, de faible amplitude et très bref.

L'émission de fluorescence présente un maximum vers 685 nm avec un épaulement à 740 nm. Dès 1931, Kautsky et Hirsch ont observé sur des algues préalablement maintenues à l'obscurité une cinétique d'induction de la fluorescence [Krause et Weiss, 1991 ; Karukstis, 1992]. La cinétique présente des irrégularités très brèves précédant la stabilisation qui survient après quelques minutes. On note deux niveaux de fluorescence :

- F_0 : composante constante de la fluorescence
- F_M : composante maximale de la fluorescence

F_v correspond à $F_M - F_0$, c'est la composante variable de la fluorescence.

F_0 provient de certaines molécules de chlorophylles *a* isolées dans l'antenne ou dont l'orientation moléculaire les rend inactives dans le transfert d'énergie au PS II.

F_M reflète le fonctionnement de la chaîne redox et dépend des conditions préilluminatoires. F_M est atteint quand le transfert électronique est actif entre Q_A , Q_B et le pool des plastoquinones qui se trouve transitoirement entièrement réduit.

Au-delà de F_M , l'induction est effective, l'émission fluorescente décroît et se stabilise ce qui traduit la mise en route complète du métabolisme, fonctionnement redox entre PS II et PS I et couplage avec la phase sombre.

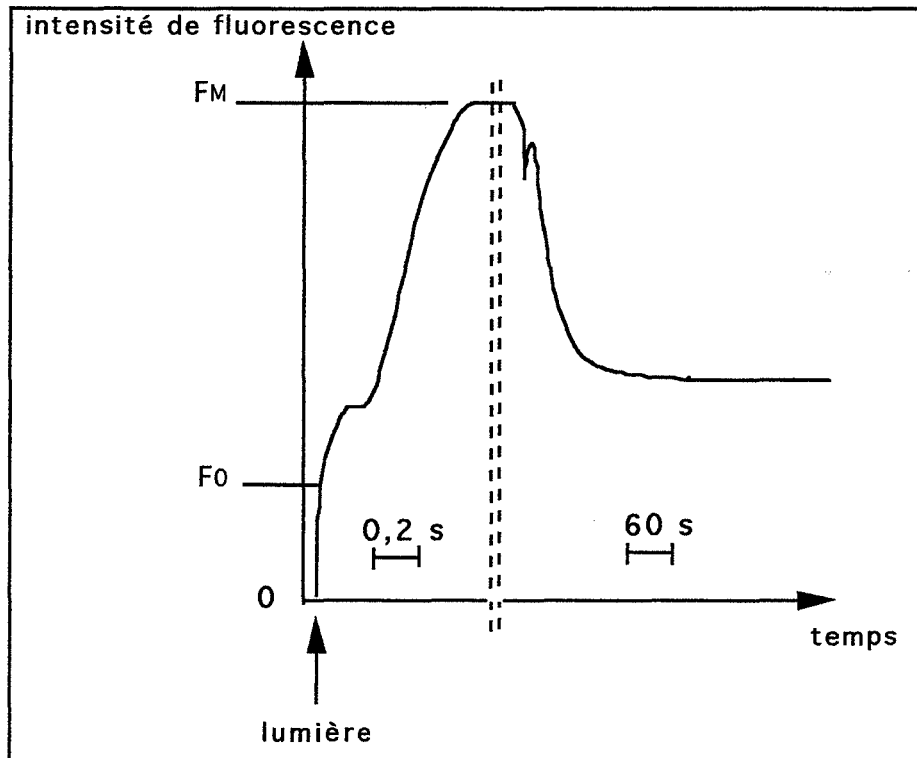


Fig. 7 : Cinétique d'induction de la fluorescence à 685 nm après une période obscure.

Le signal de fluorescence apporte des informations sur l'état fonctionnel du photosystème et par son amplitude, il permet un accès au mécanisme d'action de l'élément perturbateur.

In vitro, on observe toujours une forte fluorescence chlorophyllienne car les molécules excitées n'ont pas d'autres moyens de se stabiliser. *In vivo*, si le fonctionnement du PSII est perturbé par le blocage du transfert des électrons, le phénomène de fluorescence s'intensifiera. Au contraire, si des toxiques désorganisent l'architecture moléculaire de la membrane thylakoidienne, le signal sera affaibli car l'environnement du LHC sera dénaturé et/ou l'énergie d'excitation sera moins importante [Tremolières, 1998].

Ainsi, production d'oxygène et fluorescence chlorophyllienne sont des traceurs significatifs de l'état fonctionnel du PS II. Comme celui-ci est au point de départ de l'activité photosynthétique, métabolisme vital de l'algue, ces deux paramètres sont de bons indicateurs de la vitalité des micro-algues.

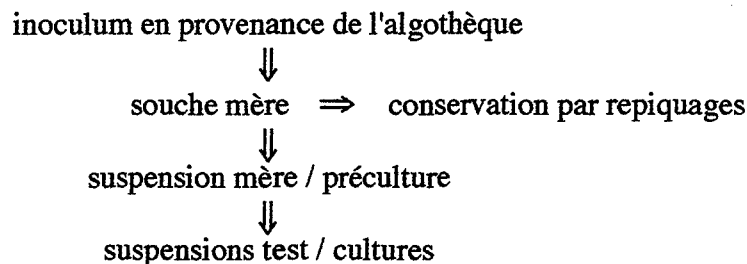
II. CULTURE DES CHLORELLES

II.1. Milieu de culture

On utilise le milieu de Lefebvre-Czarda dit oligo LC, décrit dans la norme expérimentale AFNOR ISO T 90-304 (Norme européenne, 1993) ; ce milieu est préparé à partir de 6 solutions aqueuses minérales concentrées, les solutions-mères, présentées en annexe (**Annexe 3**).

II.2. Mise en culture et maintenance

Les étapes suivantes sont détaillées en annexe (**Annexe 4**).



La souche mère est obtenue par transfert de l'inoculum sur gélose nutritive ; les tubes gélifiés sont conservés à 4° C à l'obscurité et repiqués trimestriellement. Ils permettent l'ensemencement de milieu liquide LC en flacon d'Erlenmeyer (stade préculture), puis le passage par repiquage au dixième à des cultures en bouteilles de 1 L ou en flacons d'Erlenmeyer de 500 mL.

Le contrôle sanitaire de la souche est réalisé par observation microscopique, test Gram et développement sur milieu IB (Infusion Broth de Biomérieux).

II.3. Conditions de la culture

Les précultures sont conduites sous conditions ambiantes.

Les cultures démarrent avec une concentration de cellules de 10^4 par mL.

Les suspensions algales se développent dans une enceinte climatisée :

- température = $22^{\circ}\text{C} \pm 1$
- hygrométrie = 65 %
- lumière = 16 heures de photopériode, éclairement de $50 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- aération et agitation du milieu.

Pour le développement en bouteilles, l'aération est assurée par bullage avec filtration stérilisante. Les flacons d'Erlenmeyer sont obturés par des bouchons en silicone spongieux et agités sur une table d'agitation orbitale.

Références du matériel

Climatiseur Vapac®

Deux tubes lumière du jour - 18W/10 Osram®

Pompe à air pour aquarium Riga Technic®, débit 80 L à l'heure

Unité de filtration Millipore® FG50, porosité 0,2 μm

Table d'agitation orbitale Bioblock® SC 74401, 100 tours par minute.

II.4. Suivi de la culture

On suit l'augmentation de la population ainsi que la constance des caractéristiques pigmentaires.

Références du matériel

Spectrophotomètre Kontron Instruments® -Uvikon 860

Cuve de spectrophotométrie en quartz Hellma® 100 QS

Cuve de spectrophotométrie en polyacrylate Elkay®

Lame de Thoma®

Microscope Olympus® modèle bh-2 (x 600).

II.4.1. Courbe de croissance

Le comptage des micro-algues au microscope est réalisé avec la lame de Thoma.

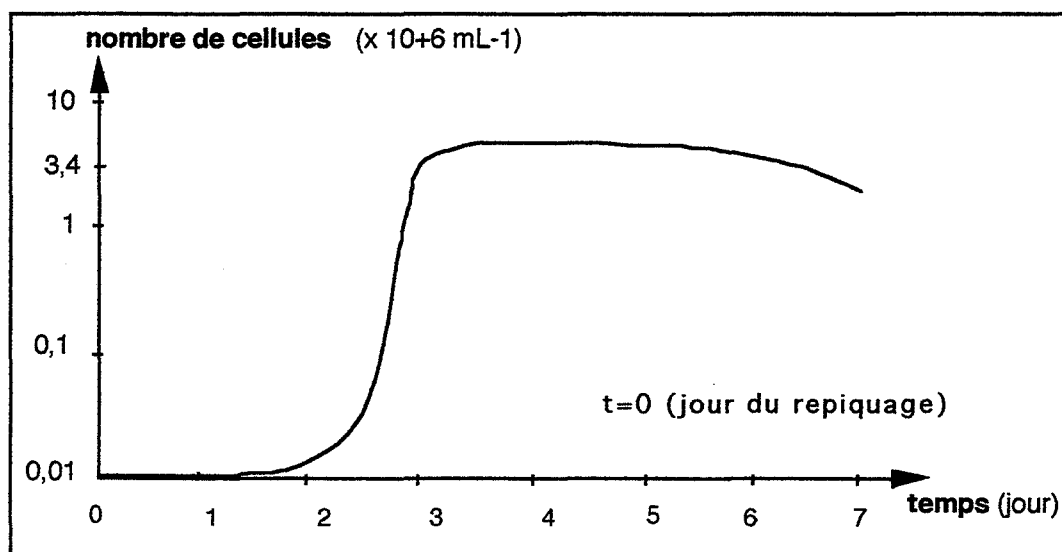


Fig. 8 : Courbe de croissance de *Chlorella vulgaris*.

On distingue sur le graphe quatre phases :

- phase de latence qui correspond à une période d'adaptation de l'algue au milieu de culture et aux nouvelles conditions
- phase de croissance exponentielle où le temps mis pour le doublement du nombre de cellules est constant
- phase stationnaire où la vitesse de croissance est nulle
- phase de déclin marquée par le ralentissement de la croissance suite à l'épuisement du milieu et à la mauvaise réception de la lumière due à la surpopulation.

II.4.2. Spectre d'absorption de la chlorophylle brute des chlorelles

La souche de *Chlorella vulgaris* présente un spectre d'absorption caractéristique, défini par l'équipement pigmentaire de la cellule ; il est établi sur le contenu pigmentaire global, extrait des cellules par action d'acétone méthanolique (85-15% v/v), on nomme celui-ci chlorophylle brute.

On procède à la vérification du spectre d'absorption lors des mises en culture et des repiquages. Le minimum est repéré à 760 nm. Les principaux pics du spectre se situent à 435, 470 et 685 nm.

II.4.3. Evaluation de la croissance

La croissance est évaluée selon deux méthodes :

- comptage au microscope, effectué à l'aide de la lame de Thoma
- évaluation de la densité optique de la suspension algale.

La densité optique (DO) est mesurée par l'intensité de la lumière transmise (I_t) à travers la suspension. A faible teneur en biomasse (C), l'intensité transmise est proportionnelle à la concentration en masse cellulaire. On a :

$$\frac{-dI_t}{dL} = \alpha \cdot I_t \cdot C$$

puis en intégrant :

$$DO = \log \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \frac{\alpha}{2,3} \cdot C \cdot L$$

avec : I_0 : intensité de la lumière incidente
 L : épaisseur de la cuve
 α : coefficient de turbidimétrie

Cette relation qui suit la loi de Beer-Lambert suppose que la lumière est absorbée ou transmise. Or, dans une suspension cellulaire, la lumière peut être aussi réfléchiée et dispersée. Un écart par rapport à la linéarité dans le sens d'une diminution est alors observé. L'importance

de cet écart dépend du système de mesure et de la concentration cellulaire. Nous optimisons les mesures en utilisant le spectrophotomètre dont le photomultiplicateur, situé loin de la cuve, reçoit principalement la lumière transmise et nous ne travaillerons qu'avec des suspensions suffisamment diluées.

On choisit d'utiliser une longueur d'onde monochromatique pour laquelle l'absorption des pigments chlorophylliens des cellules est nulle, soit $\lambda = 760 \text{ nm}$.

La Figure 9 décrit l'évolution de la population algale en fonction de la densité optique de la suspension. Les mesures sont réalisées sur des suspensions algales en phase de croissance exponentielle, les DO sont ajustées par dilutions successives.

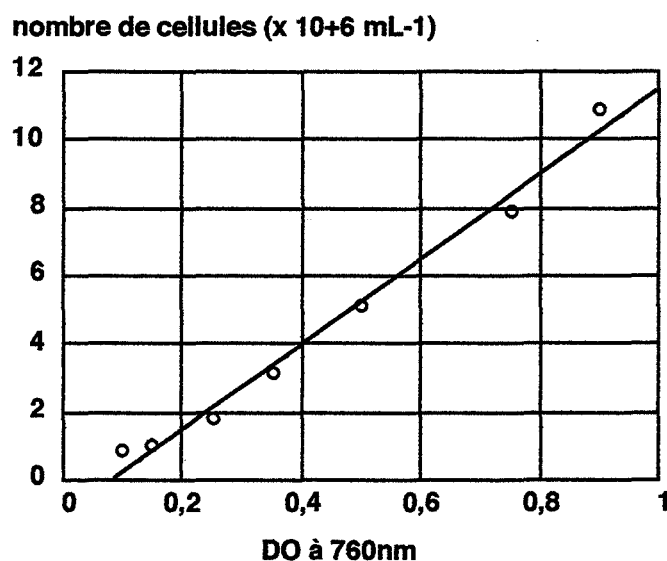


Fig. 9 : Population déterminée par comptage à la lame de Thoma ($n = 5$) en fonction de la densité optique de la suspension algale mesurée à 760 nm.

Il existe une relation entre la densité optique de la suspension et la population des algues (N millions de cellules par mL), estimée grâce à la lame de numération. Elle est linéaire sur le domaine d'étude, la meilleure corrélation se situe pour les densités optiques comprises entre 0,18 et 0,6.

Dans le domaine de linéarité, la relation s'exprime par la formule suivante avec un coefficient de corrélation (R) égal à 0,993 :

$$N = - 0,93 + 12,45 \cdot DO_{760}$$

Cette courbe établie à partir de 5 dénombrements pour chaque densité optique nous sert de référence pour estimer rapidement la concentration en cellules d'une suspension connaissant sa densité optique.

III. IMMOBILISATION DES CHLORELLES

L'immobilisation des micro-algues est requise pour l'observation en microscopie électronique et pour la réalisation des biocapteurs :

- ♦ *biocapteur électrochimique*, le support algal doit être ajusté à l'extrémité de l'électrode.
- ♦ *biocapteur fluorimétrique*, le support algal est fixé à l'extrémité du faisceau de fibres optiques.

Dans les deux cas, le diamètre du transducteur n'excède pas 1 cm.

III.1. Méthode d'immobilisation

Il existe plusieurs techniques d'immobilisation des micro-algues : adsorption, réticulation, inclusion dans un gel, micro-encapsulation [Callegari, 1989-b].

La gélification est une technique très employée en biotechnologie car elle respecte deux exigences absolues, d'une part des conditions d'immobilisation peu stressantes, d'autre part, le maintien des conditions de vie optimales après immobilisation. Ainsi, sont couramment employés les gels de polyéthylène-glycol, de polyuréthane (gélification par polymérisation), et les gels d'alginate de calcium (gélification par interactions ioniques).

Pour notre étude, nous recherchons une méthode unique convenant aux deux types de biocapteurs. Les contraintes inhérentes à leur utilisation telles que diffusion de la lumière et des molécules, absence d'interférences lumineuses, faible épaisseur, résistance aux manipulations, nous conduisent à éliminer la gélification. Le recours au glutaraldéhyde comme agent réticulant n'est pas envisagé car jugé trop dénaturant à long terme [Thomasset, 1982]. Nous sélectionnons l'immobilisation sur membrane, c'est une **méthode de rétention physique**. Elle a été utilisée dans le cas d'électrodes algales [Pandard, 1992 ; Rawson et al., 1989].

Un prélèvement algal effectué sur une culture en croissance exponentielle, soit le quatrième jour après le repiquage, est réparti sur une membrane par filtration sous vide modéré (unité de filtration Nalgène®) ; les paramètres -volume et densité optique- de la partie aliquote dépendent de l'expérimentation ; ils diffèrent suivant que l'on travaille en fluorimétrie, en électrochimie ou en microscopie.

Cette technique assure une répartition homogène des algues sur la membrane, elle est facile, rapide, son coût est peu élevé.

III.2. Choix du support pour l'immobilisation

Le choix est guidé par l'utilisation.

Pour l'observation microscopique, les critères retenus sont présentés dans (I, chap.5).

Les critères suivants sont requis dans le cas des biocapteurs :

- bonne rétention algale sans désorption au cours des rinçages
- optimisation des conditions de vie des algues (humidité + diffusion du CO₂ + diffusion de la lumière)
- absence de contamination vis-à-vis des cellules et du milieu
- matériau inerte, sans matière organique, limitant la prolifération microbienne
- autoclavable ou stérile
- résistance mécanique lors des manipulations et chimique lors de l'utilisation des toxiques.

Une sélection est opérée dans la gamme des membranes commercialisées par Whatman, et Schleicher et Schul :

- filtres d'épaisseur en fibres de verre
- filtres de surface en nylon, nitrate de cellulose, esters de cellulose, aluminium et polycarbonate.

Les filtres de surface s'avèrent médiocres pour certains critères : résistance mécanique déficiente, résistance chimique inadaptée à l'usage de certains toxiques, insuffisance de la rétention, inconstance du paramètre humidité.

Les filtres d'épaisseur ont l'avantage d'assurer une meilleure rétention des algues, pas de désorption aux rinçages des membranes et de maintenir les conditions d'humidité nécessaires. De plus, l'absence de charges négatives pouvant retenir les cations lors des mesures de toxicité métallique est favorable à la détection.

Les filtres Whatman® GF/C (100 % borosilicate, épaisseur 260 µm, porosité 1,2 µm) sont utilisés pour le biocapteur électrochimique, alors que les filtres Whatman® QM/A (100 % silice, épaisseur 450 µm, porosité 1,2 µm) sont utilisés pour le biocapteur fluorimétrique, en raison d'une plus grande pureté du matériau garantissant la reproductibilité de l'absence d'interférences lors des mesures de fluorescence.

Une partie aliquote de culture en phase exponentielle est déposée en une opération sur un filtre de diamètre 47 mm ; grâce à une technique reproductible de découpe du filtre, on constitue un lot de 15 à 20 membranes, chacune portant un grand nombre de cellules. A titre d'exemple, voici les valeurs concernant le biocapteur électrochimique : 20 mL de suspension algale dont la DO₇₆₀ est 0,35 représentent 2,5 millions de cellules immobilisées par membrane.

III.3. Conservation des membranes algales

Dans le cadre d'une utilisation de routine, *in situ*, le système mis en place doit être simple et nécessiter des interventions de maintenance les moins lourdes possibles. Il est donc important de disposer d'un biorécepteur répondant à des exigences de sensibilité, longévité, reproductibilité et qui soit disponible sous une forme de stockage évitant alors la préparation *ex temporane* du biocapteur.

Les micro-algues comme tout matériel biologique peuvent subir un traitement afin d'optimiser leur conservation. Des essais de lyophilisation, congélation, cryocongélation des micro-algues (*Scenedesmus* et *Chlorella*) n'ont pas abouti [Pandard, 1992]. Les micro-algues immobilisées sur membrane ne retrouvent pas leur activité métabolique complète au niveau de la production d'oxygène. En fait, les travaux de conservation par le froid des thylakoïdes, réalisés par l'équipe de Santarius (1990) démontrent une grande fragilité du système enzymatique du PS II.

Etant donné la simplicité et la rapidité d'obtention d'un lot de membranes, nous n'avons pas, après les travaux rapportés ci-dessus, cherché à expérimenter dans ce domaine.

Seule la conservation par le froid (à + 4° C) sera utilisée.

♦ *Les membranes maintenues en atmosphère humide saturée* sont conservées plusieurs jours à plusieurs semaines :

- à la lumière ambiante, les algues conservent alors des caractéristiques physiologiques stables au cours du temps

- à 22°C, sous une photopériode de 16 heures, la croissance des cellules réduit la durée d'utilisation de la membrane : le signal diminue au cours du temps, la surcharge en cellules étant préjudiciable à la réception individuelle de la lumière

- après un séjour à l'obscurité et à 4° C, la membrane est réutilisable ; la perte d'activité dépend de la durée du séjour. Une phase d'acclimatation à la lumière s'impose.

♦ *Les membranes algales supportent la dessiccation* : des membranes "sèches" conservées plusieurs semaines retrouvent après réhydratation un signal caractéristique dans 66% des cas.

Ces conclusions sont confirmées par les résultats présentés dans le chapitre 4 consacré au biocapteur de fluorescence algale.

La conservation requiert l'autoclavage du matériel et du milieu mais l'immobilisation n'est pas réalisée de façon stérile. Cependant, nous n'avons pas observé de contamination préjudiciable à l'expérimentation : les précautions prises lors des manipulations, le temps bref de la filtration, l'absence de milieu nutritif organique sont garants d'un faible développement microbien.

IV. CONCLUSION

Chlorella vulgaris possède les caractéristiques suivantes :

- la biologie et la physiologie sont bien connues
- la croissance est rapide
- la culture est facile et peu onéreuse (pas de substrat, ni tampon)
- la méthode d'immobilisation par lot que nous employons est simple, réalisable avec peu de matériel et durable
- les algues immobilisées donnent une réponse *in vivo*
- le grand nombre de cellules immobilisées sur une membrane permet l'obtention d'un signal à valeur statistique
- les chlorelles appartenant au groupe des producteurs primaires, premiers maillons des chaînes alimentaires, donnent une réponse :
 - * représentative de l'impact de la substance toxique sur la matière végétale,
 - * informative sur les répercussions supportées par l'ensemble de l'écosystème.

Ainsi, *Chlorella vulgaris* est un biorécepteur possible pour biocapteur et un bio-indicateur potentiel.

CHAPITRE 3

**BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE A
BIORECEPTEURS CHLOROPHYLLIENS**

CHAPITRE 3

BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE A BIORECEPTEURS CHLOROPHYLLIENS

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier la faisabilité d'un biocapteur ampérométrique utilisant des éléments chlorophylliens pour la détection de toxiques dans l'environnement.

I - ETUDE EN MILIEU AQUEUX

La partie bibliographique a montré l'intérêt de ce type d'étude pour le suivi écotoxicologique de l'eau. Deux biorécepteurs sont testés pour l'étude en milieu aqueux ; il s'agit de *Chlorella vulgaris* et des thylakoïdes (extraits de la feuille d'épinard).

II - ETUDE EN MILIEU GAZEUX

Etant donné le manque d'étude concernant l'analyse de l'air par des bioessais et compte-tenu des potentialités biologiques des chlorelles, nous avons voulu tester le biocapteur algal en conditions atmosphériques. Permet-il la détection, voire le dosage de gaz toxiques ?

Cette étude est originale et ciblée : elle concerne trois produits dangereux qui font l'objet d'une réglementation pour les locaux de travail et auxquels l'algue est sensible ; il s'agit de deux produits volatils, le perchloroéthylène et le méthanol et d'un produit peu volatil, le paraquat.

AVANT-PROPOS

Les thylakoïdes ont été présentés dans les chapitres précédents. Ces structures intrachloroplastiques sont le siège de la phase lumineuse de la photosynthèse. Ils effectuent la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique via la chaîne redox et produisent l'oxygène. Cette dernière réaction est considérée comme un marqueur de la vitalité du biorécepteur (1.4, chap.2).

Dans les années 1980, les thylakoïdes sont étudiés pour approfondir les mécanismes de la photosynthèse et dans la perspective d'exploiter les produits de cette filière métabolique ; très fragiles et donc instables *in vitro*, ils sont immobilisés par diverses techniques entre 1982 et 1989. Les travaux de Cocquempot et al.(1981) et de Carpentier et al.(1991), entre autres, ont montré la grande réactivité des thylakoïdes vis-à-vis des herbicides anti-PS II. Aujourd'hui, les recherches continuent sur l'emploi de ces biorécepteurs dans des applications analytiques en phase aqueuse. Pandard et al.(1993) maintiennent les thylakoïdes dans leur environnement cellulaire (micro-algues) alors que les travaux de Rouillon et al.(1995) portent sur des thylakoïdes extraits.

Notre contribution dans ce domaine d'étude consiste à réaliser un nouveau biocapteur avec la méthode d'immobilisation que nous avons développée car la qualité d'un biocapteur est très dépendante de la fixation du biorécepteur. Nous nous proposons également d'élargir le spectre des produits testés. D'autre part, nous avons adapté le biocapteur au fonctionnement en phase gazeuse.

Alors que de nombreux biocapteurs sont à l'étude, voire opérationnels, pour le dosage de composés toxiques dans l'eau, ces mêmes outils font défaut pour le contrôle des atmosphères gazeuses. Les travaux utilisant des méthodes biotechnologiques sont en fait des méthodes indirectes où le biocapteur fonctionne en phase liquide après solubilisation du gaz. Toutefois, quelques travaux relatifs à la détection de vapeurs organiques sont connus :

- étude de Dennison et al.(1996) concernant la mise au point d'une électrode enzymatique de type ampérométrique pour le dosage du formaldéhyde et des vapeurs phénoliques

- étude de Haggett et al.(1995) utilisant un biocapteur ampérométrique à *Escherischia coli* pour le dosage des vapeurs de toluène, xylène, et du formaldéhyde.

Comme les deux éléments de notre biocapteur algal sont utilisables en conditions atmosphériques, nous le testerons en présence de vapeurs et d'aérosols toxiques. Cependant des contraintes existent:

- côté électrode à oxygène : la membrane hydrophobe de l'électrode est sélectivement perméable à l'oxygène seul. Les facteurs ambiants tels que humidité, température, pression influencent la solubilité du gaz, ces facteurs doivent rester constants lors des mesures.

- côté chlorelles : la souche de *Chlorella vulgaris* est typiquement aquatique mais des clones voisins vivent en milieu subaérien, sur les troncs d'arbres par exemple, et lors des essais d'immobilisation, les micro-algues ont montré des capacités à rester fonctionnelles en atmosphère humide sans la présence d'une phase liquide réelle, il suffit d'un certain degré d'hydratation de la membrane (III, chap.2).

En conséquence, pour utiliser en phase gazeuse le biocapteur algal, on lui adjoint un système d'humidification qui assure la disponibilité en eau pour les cellules et une hygrométrie constante au voisinage de la membrane hydrophobe de l'électrode.

I. ETUDE EN MILIEU AQUEUX

I.1. Matériel et méthode

I.1.1. Chaîne de mesure

La chaîne de mesure comprend 4 modules :

- le biocapteur ampérométrique, qui est une électrode à oxygène associée à une membrane bioréceptrice porteuse des algues ou des thylakoïdes (Figure 10)

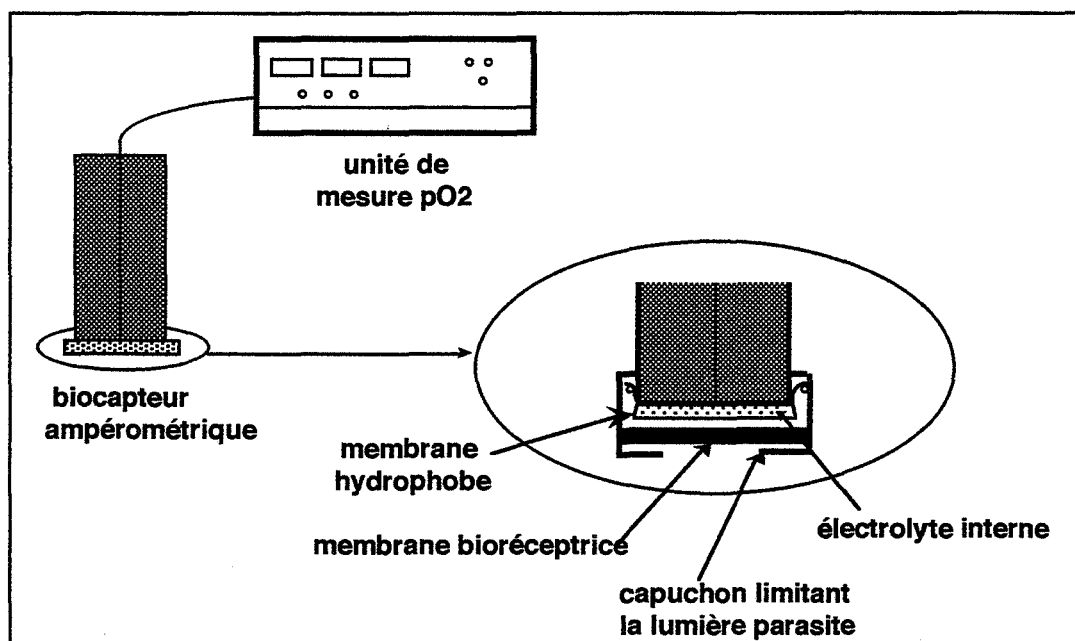


Fig. 10 : Représentation schématique du biocapteur.

- l'unité de mesure de pO_2 connectée à l'enregistreur
 - la cellule de mesure : 2 modèles ont été conçus en collaboration avec le maître-verrier pour recevoir le biocapteur
 - la source lumineuse.

Références du matériel

Electrode de pO_2 , E5046-0 Radiometer® avec membrane de polypropylène Radiometer® ou de PTFE Bioblock®

Unité de mesure de pO_2 : PHM 73 pH/BLOOD GAS MONITOR Radiometer®

Enregistreur Sefram® Paris

Micro-cellules de mesure thermostatées Verre Labo Mula®, isolées de la lumière ambiante par du papier aluminium

Source lumineuse à fibres optiques Schott® KL 1500 electronic, commandée par un programmeur

Bain thermostaté Colora®

Pompe péristaltique Ismatec SA® à vitesse fixe, 50 tours par minute

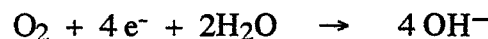
Tuyaux pour la circulation du flux, calibrés à différents diamètres Tygon®.

Les deux montages pour l'utilisation du biocapteur en mode batch ou en mode flux sont présentés dans les Figures 11 et 12 ci-contre.

I.1.2. Méthode et mode opératoireI.1.2.1. Principe de mesure de la pression partielle en oxygène

La pression partielle en oxygène est mesurée au moyen d'une électrode ampérométrique à diffusion en oxygène (électrode de CLARK).

Le principe repose sur la diffusion de l'oxygène à travers une membrane hydrophobe, suivie de sa réduction au niveau d'une électrode de platine polarisée à un potentiel négatif (- 0,650 V), l'anode est une électrode de référence, Ag/AgCl/Cl⁻ :



Cette réduction engendre un courant électrique. Le flux d'oxygène traversant la membrane hydrophobe est proportionnel à la pression partielle en oxygène (pO_2) du milieu. L'intensité du courant recueilli est donc proportionnelle à cette pO_2 .

I.1.2.2. Etalonnage de l'électrode

L'étalonnage a lieu dans l'eau, il se fait en deux étapes.

Le premier point est l'étalonnage à 0 % d'oxygène. Pour cela, l'électrode est plongée dans une solution ne contenant pas d'oxygène (barbotage de l'azote pur dans l'eau au contact de l'électrode). La valeur de pO_2 est ajustée à 0 mm Hg.

Le second point est l'étalonnage à 20 % d'oxygène (mélange gazeux à 20 % O_2 et 80 % N_2). La formule suivante permet de calculer la valeur à afficher :

$$pO_2 = (P_{atm} - P_{H_2O}) \cdot 0,2$$

pO_2 : pression partielle en O_2 en mm Hg (valeur à afficher)

P_{atm} : pression atmosphérique en mm Hg

0,2 : taux ambiant en oxygène (20 %)

P_{H_2O} : pression en vapeur saturante en mm Hg à la température choisie

L'étalonnage a lieu avant chaque expérience ; la membrane hydrophobe est renouvelée tous les 7 jours environ.

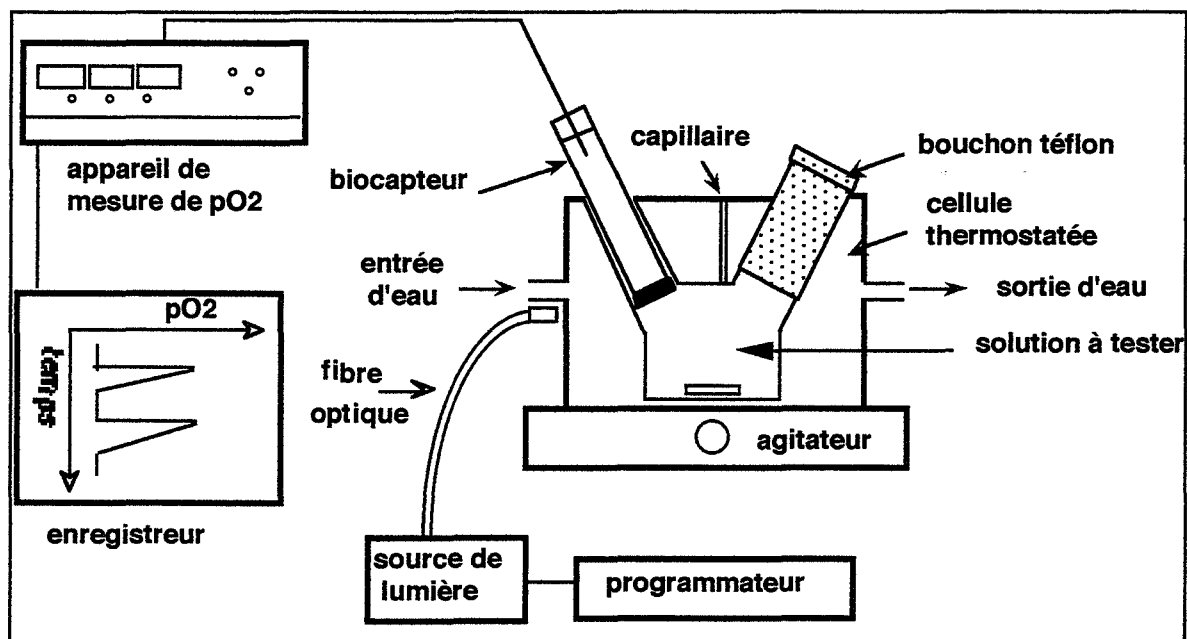


Fig. 11 : Chaîne de mesure pour l'utilisation en batch du biocapteur à biorécepteurs chlorophylliens.

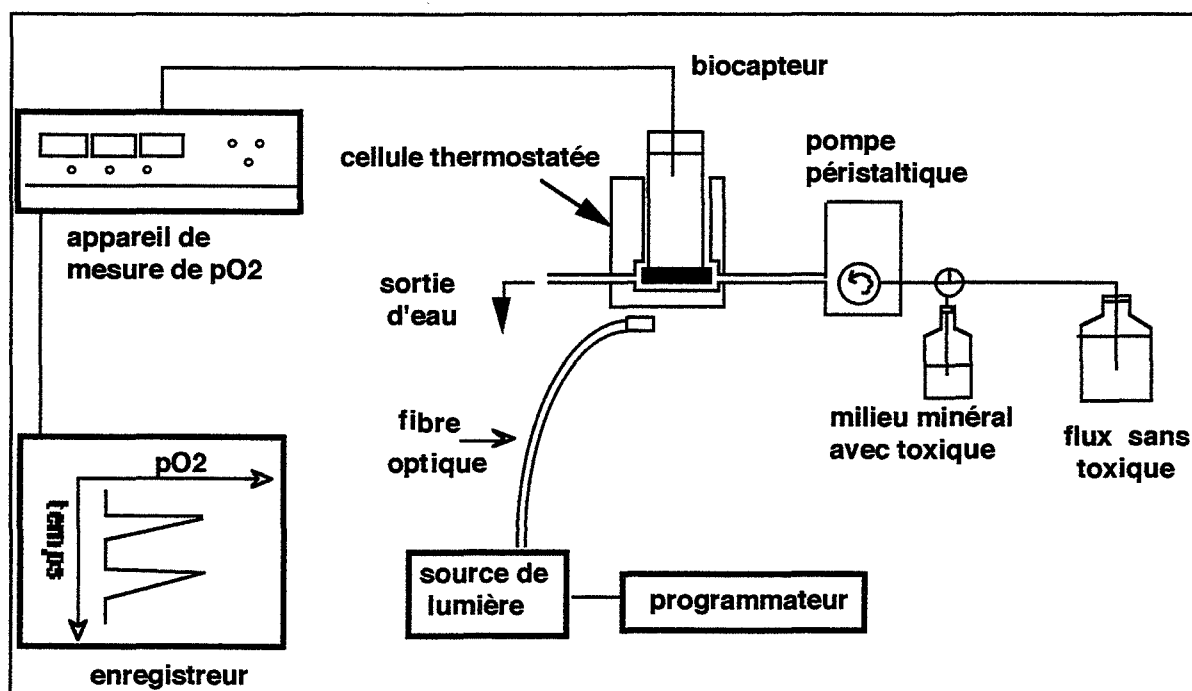


Fig. 12 : Chaîne de mesure pour l'utilisation en flux du biocapteur à biorécepteurs chlorophylliens.

I.1.2.3. Obtention des biorécepteurs

L'obtention est bien différente suivant le biorécepteur.

Pour les algues, une partie aliquote est prélevée dans la culture en phase exponentielle. 20 mL de suspension algale de $DO_{760} = 0,35$ suffisent pour la préparation immédiate d'un lot de 15 membranes.

Pour les thylakoïdes, la préparation est lourde car ces organites sont sub-cellulaires. Les thylakoïdes sont extraits des feuilles d'épinard achetées chez le même producteur. Ce végétal est connu pour sa richesse en chloroplastes. Le mode opératoire suit le protocole traditionnel [Hipkins, 1986], il est personnalisé pour quelques points (**Annexe 5**).

Ces structures membranaires extraites des cellules sont infiniment fragiles ; elles sont sensibles à la lumière, à la température, au pH ; elles nécessitent le recours à une solution tampon et à un agent osmotique.

I.1.2.4. Réalisation du biocapteur

Il s'agit d'associer l'élément biologique immobilisé au voisinage du transducteur.

♦ *Immobilisation des algues*

La méthode d'immobilisation a été décrite précédemment (**III, chap.2**). Des membranes de diamètre 9 mm sont découpées dans le filtre GF/C Whatman® et placées au contact de la membrane hydrophobe de l'électrode ; les membranes sont maintenues en place par un capuchon opaque en plastique souple.

♦ *Immobilisation des thylakoïdes*

Différentes méthodes ont été décrites visant à améliorer la stabilité des thylakoïdes [Cocquempot et al., 1981 ; Lemieux, 1988]. Aussi avons-nous procédé à une étude comparative afin de choisir la méthode la plus satisfaisante vis-à-vis des critères énoncés précédemment (**III, chap.2**) tout en prenant en compte la fragilité des thylakoïdes.

Nous travaillons sur les thylakoïdes et non sur les chloroplastes, la taille de ces derniers est incompatible avec une immobilisation durable.

La comparaison porte sur trois méthodes dont deux sont empruntées à la littérature, la troisième reprend la méthode que nous avons mise au point pour les chlorelles puisqu'elle satisfait le mieux possible aux critères exigés. Les deux autres méthodes recourent à des gels qui, d'après leurs auteurs, pourraient protéger les thylakoïdes.

	Techniques d'immobilisation		
	Alginate de sodium	DEAE-cellulose	Filtres GF/C
Référence	Gisby, Hall, 1980	Shioi, Sasa, 1979	notre protocole
Signal	négligeable	faible, instable	irrégulier
Hypothèse explicative	diffusion de l'oxygène dans le gel?	nature du gel, échangeur ionique	désorption : porosité inadéquate à la taille des thylakoïdes

Tab. 12 : Comparaison des trois méthodes d'immobilisation des thylakoïdes.

Les protocoles sont inspirés des références citées.

Les résultats sont décevants, une autre méthode est recherchée.

Dans notre laboratoire, les membranes Pall sont couramment utilisées et appréciées comme support enzymatique. Nous les testons comme support des thylakoïdes.

Les membranes PALLTM de PALL Industries, type Immunodyne, sont des membranes de polyamide préfonctionnalisées. Sur ces membranes poreuses ont été greffés des groupements fonctionnels de nature confidentielle.

Un simple contact du biocatalyseur avec les membranes suffit au greffage. La méthode par immersion et celle du dépôt par goutte (spot-wetting) sont utilisées en routine dans notre laboratoire pour l'immobilisation des enzymes.

Matériel et réactifs

Membranes PALLTM (PALL Industries, type Immunodyne)

Tampon réaction d'après Mimeault (1989) :

-50 mM TES-NaOH pH 7

-330 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM NH₄Cl

Ferricyanure de potassium (FCK) - Merck®. Solution mère : 1 M

Chlorure d'ammonium (NH₄Cl) - Merck®. Solution mère : 0,1 M

Glutaraldéhyde 0,33% v/v dans l'eau - Sigma®; solution mère 25 % (v/v)

Albumine de sérum bovin (BSA) 5 % (w/v) dans du tampon TES réaction

Silica gel

Pour l'immobilisation, deux protocoles sont envisagés.

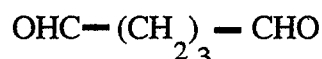
♦ *Adsorption des thylakoïdes sur membranes Pall*

A notre connaissance, cette méthode n'est pas décrite dans la littérature pour l'immobilisation des thylakoïdes. L'adsorption ne met en jeu que les groupes fonctionnels des

membranes PALL™ et surtout des phénomènes physiques d'adsorption. Les thylakoïdes sont ainsi retenus à la surface de la membrane.

♦ *Adsorption et réticulation des thylakoïdes sur membranes Pall*

Le glutaraldéhyde est un agent réticulant des protéines, également employé depuis longtemps pour la fixation des thylakoïdes [Lemieux, 1988 ; Purcell et al., 1990 ; Thomasset et al., 1982]. C'est un dialdéhyde de formule :



Il se trouve essentiellement sous forme polymérisé. Les protéines se fixent par leurs fonctions amines en réagissant avec les fonctions aldéhydes du polymère. La fonction imine formée est stabilisée par résonance de la fonction éthylénique proche.

D'après Cocquempot (1981), le glutaraldéhyde, correctement dosé, est aussi efficace pour stabiliser les thylakoïdes. Nous renforçons l'adsorption sur les membranes PALL™ par une réticulation par le glutaraldéhyde. L'objectif est d'améliorer la stabilisation par l'effet chélateur du glutaraldéhyde.

♦ *Mode opératoire*

Les membranes PALL™ sont découpées (diamètre 9 mm) puis séchées sur Silica gel, sous flux d'azote. On dépose sur les membranes sèches 20 µl de la suspension des thylakoïdes. Puis les membranes sont séchées comme précédemment. On obtient ainsi les membranes adsorbées. Elles sont alors soit conservées à + 4° C soit réticulées. Pour ce faire, les membranes sont placées dans des béchers de 1 mL et immergées dans la solution de BSA à 5 % pendant 15 minutes à + 4° C. Puis la BSA est remplacée par le glutaraldéhyde à 0,33 %. La réticulation dure 30 minutes à + 4° C. Les membranes sont ensuite rincées deux fois dans du tampon TES réaction. Elles sont alors séchées et conservées à + 4° C.

1.1.2.5. Conditions expérimentales

♦ *Pour les thylakoïdes*

La quantité de chlorophylle utilisée s'inspire des travaux précédents, soit 40 µg par membrane environ ; la quantité de chlorophylle est dosée selon la méthode de Arnon (1949).

Pour l'illumination, un flash de 30 secondes est délivré par la fibre optique de la source lumineuse suivie d'une période d'obscurité de 5 minutes ; ces valeurs prennent en compte la nécessité d'obtenir un signal ample tout en préservant au mieux les thylakoïdes de la photoinhibition.

Les mesures sont effectuées à 20° C dans la cellule, en mode batch, avec la solution tampon réaction additionnée d'un accepteur d'électrons (FCK) et d'un découplant (NH₄Cl).

♦ Pour les algues

L'étude est conduite en batch et en flux, à 20° C.

Le volume de la cellule en flux est de 1 mL, elle est alimentée par une circulation de milieu oligo LC avec possibilité de faire varier le débit.

Les paramètres : charge algale des membranes, cycle d'illumination sont optimisés. L'effet des autres paramètres est étudié.

♦ Effet des toxiques

Le milieu LC ou le tampon Tes réaction, à pH 7 et 20° C, servent de milieu témoin.

Les solutions toxiques sont préparées comme indiqué au (II.2.2, chap.1) et ajoutées au milieu témoin au début de la période obscure donc l'enregistrement du 1^{er} signal a lieu après 5 minutes d'incubation.

Les résultats concernant l'effet des toxiques sont des moyennes obtenues avec $n = 3$ membranes, $n = 5$ pour les solvants.

L'électrode de pO₂ est équipée d'une membrane hydrophobe en polypropylène sauf pour méthanol et perchloroéthylène qui nécessitent l'emploi d'une membrane en téflon afin d'assurer l'indifférence du transducteur vis-à-vis du toxique testé.

La réversibilité est testée après rinçage :

- en batch, par 3 lavages rapides en milieu témoin,
- et en flux par passage du milieu LC à 3 mL.min⁻¹ pendant des temps variables selon les produits.

La 1^{ère} mesure de réversibilité est effectuée 15 minutes après la fin du rinçage en batch et à partir de 5 minutes en flux. La durée de ces tests est limitée à 2 heures. La réversibilité est déclarée totale si la récupération du signal atteint 95 % du signal témoin en moins d'une heure.

♦ Caractérisation du signal

Pendant l'illumination, les chlorelles produisent instantanément de l'oxygène ; le biocapteur réagit au bout de 10 secondes, puis on observe l'augmentation rapide de la pression partielle en oxygène du milieu. En présence de toxique, la production d'oxygène est réduite. Dans la Figure 13, P₀ et P désignent l'amplitude du signal respectivement en absence et en présence de toxique .

Le pourcentage d'inhibition I % induit par le toxique est défini alors par :

$$I \% = 100 \frac{P_0 - P}{P_0}$$

La limite de détection est la concentration du composé à doser engendrant un signal d'amplitude égal à 3 fois le bruit de fond.

La pO₂ est exprimée en mm Hg ; dans certaines figures, le signal sera exprimé en unité arbitraire (UA).

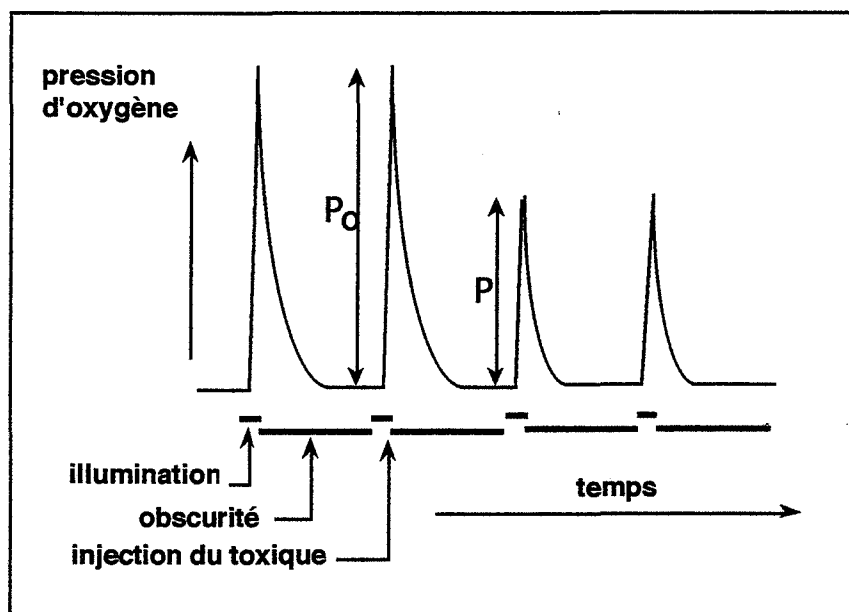


Fig. 13 : Signal témoin et signal sous toxique.

1.2. Résultats de l'étude relative aux thylakoïdes

Des essais préliminaires montrent qu'il est nécessaire de laisser incuber les membranes 10 minutes dans les conditions opératoires avant de commencer les essais, de façon à obtenir une réponse maximale. Ce délai est une période d'acclimation aux nouvelles conditions, en effet après immobilisation, les membranes sont conservées sèches et à + 4° C.

1.2.1. Réaction aux herbicides

Le mode d'extraction des thylakoïdes, puis la méthode d'immobilisation permettent-elles de détecter des herbicides ?

L'atrazine, le diuron, herbicides dont la cible est le PS II, ainsi que l'aminotriazole et le glyphosate sont testés.

	Atrazine	Aminotriazole	Diuron
Limite de détection	0,02 μM	20 μM	0,06 μM
CI50	0,15 μM	12 mM	0,9 μM

Tab. 13 : Détection de trois herbicides par le biocapteur à thylakoïdes utilisé en batch, n = 3 membranes.

La sensibilité du biocapteur vis-à-vis de ces 3 produits est grande. En revanche, le **glyphosate** est inopérant sur le biocapteur à thylakoïdes dans nos conditions expérimentales. Ces résultats nous amènent à étudier les performances de ce biocapteur .

1.2.2. Répétabilité du biocapteur à thylakoïdes

La *répétabilité* est relative à l'accord entre les résultats des mesures successives effectuées dans les mêmes conditions opératoires.

Les membranes à thylakoïdes réticulés ou adsorbés sont soumises à une série de flashes de 30 secondes. La Figure 14 montre le comportement de ces membranes.

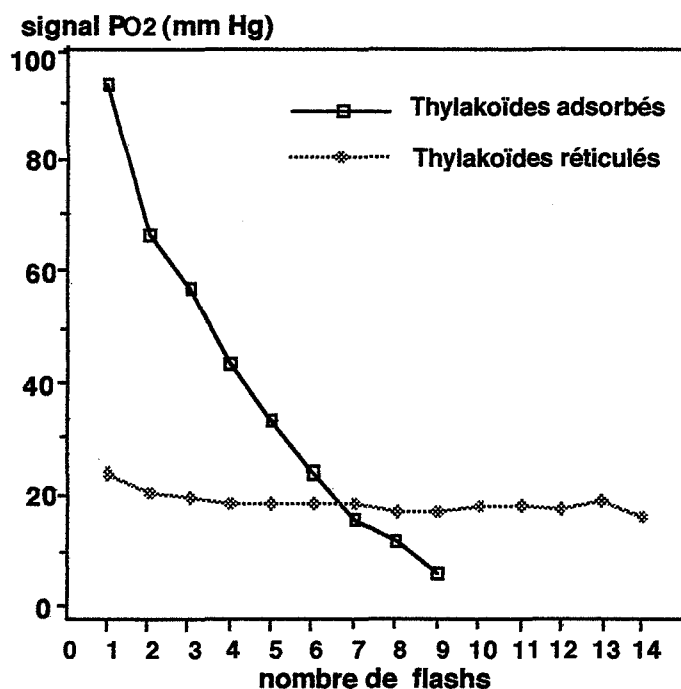


Fig. 14 : Réponse du biocapteur à thylakoïdes pour une série de flashes.

L'adsorption ne résout pas le problème de la stabilité : le signal de départ est important ($pO_2 = 93$ mm Hg), mais la perte d'activité est rapide et après 9 flashes, 94 % de l'activité initiale est perdue.

La réticulation par le glutaraldéhyde stabilise l'activité, néanmoins elle provoque une baisse de cette activité. Cette perte est importante (75 %), toutefois le signal est jugé suffisant (moyenne $pO_2 = 18,6$ mm Hg) pour envisager une étude d'inhibition.

Nos résultats confirment que la concentration de 0,33 % en glutaraldéhyde stabilise les thylakoïdes exposés à une stimulation lumineuse répétée. C'est un facteur primordial pour le fonctionnement du biocapteur.

1.2.3. Stabilité à long terme

Pour étudier la stabilité au cours du temps, nous fabriquons deux lots de 20 membranes, un lot de membranes à thylakoïdes réticulés et un lot à thylakoïdes adsorbés. Après le séchage à l'azote, elles sont conservées à l'obscurité et à $+4^\circ\text{C}$, puis testées chaque jour.

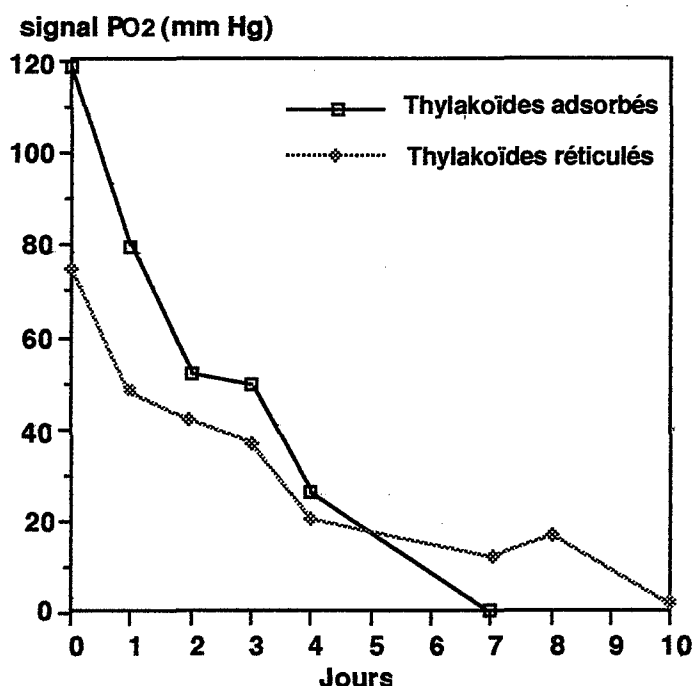


Fig. 15 : Réaction au cours du temps des membranes à thylakoïdes.

La Figure 15 montre que la méthode d'immobilisation par réticulation est plus efficace que l'adsorption puisque 50 % de l'activité est conservée après 3 jours, alors qu'après 48 heures, 50 % de l'activité des membranes adsorbées a disparu.

On note également une chute brutale de l'activité pendant les premières 24 heures, puis une légère stabilisation les deux jours suivants. Ces essais confirmés par ailleurs montrent que l'effet bénéfique de la réticulation est surtout sensible après 24 heures ou une nuit à + 4° C.

1.2.4. Reproductibilité du biocapteur à thylakoïdes

La *reproductibilité* est relative à l'accord entre les résultats des mesures obtenues en faisant varier les conditions opératoires.

L'utilisation de ces membranes, dans un système de dosages, nécessite d'avoir la reproductibilité des signaux afin d'assurer la reproductibilité du dosage lui-même.

Membranes	Moyenne (μ)	Ecart type (s)	CV (%)
Thylakoïdes réticulés	23,9	4,3	17,9
Thylakoïdes adsorbés	66,7	7,5	11,3

Tab. 14 : Reproductibilité des membranes portant des thylakoïdes adsorbés ou des thylakoïdes réticulés, n=10 membranes.

Ces résultats sont peu reproductibles. La méthode d'immobilisation par spot-wetting est-elle en cause ?

C'est une méthode facile et immédiate. Les membranes sont préparées une par une. Les variations du volume de la goutte déposée sur la membrane suffisent sans doute à expliquer l'écart-type : l'hétérogénéité des réponses proviendrait de la différence de quantité de thylakoïdes déposés car les suspensions sont très denses.

1.2.5. Amélioration de la méthode d'immobilisation des thylakoïdes

Pour remédier à la faible reproductibilité des réponses, on recourt à la méthode d'immobilisation par immersion.

Le lot des membranes est directement plongé dans la suspension de thylakoïdes riche de 1,4 mg de chlorophylle par mL, l'immersion a lieu en présence de tampon Hepes (50 mM pH 7,5) additionné de BSA 5 % (w/v) pendant des temps variables sur une table d'agitation, dans de la glace. Puis l'immobilisation est complétée par la réticulation dans un bain de glutaraldéhyde à 0,33 % pendant 30 minutes à température ambiante.

La méthode est efficace puisque nous avons pu enregistrer des réponses plus reproductibles : $n = 10$ mesures $\mu = 15$ UA $CV = 9,8 \%$ $\sigma = 2,15$.

Mais les amplitudes du signal sont plus faibles qu'avec la méthode du spot-wetting. Ceci peut s'expliquer par une quantité de chlorophylle fixée moins importante.

Une deuxième série d'essais a été faite en augmentant la quantité de chlorophylle (1,74 mg.mL⁻¹ de chlorophylle). Les signaux enregistrés sont plus importants. Cependant, nous n'avons pu aller au-delà de cette concentration sans alourdir le protocole d'extraction des thylakoïdes.

1.3. Résultats de l'étude relative aux micro-algues

1.3.1. Effet de la charge algale

Les membranes sont confectionnées immédiatement après le prélèvement d'une partie aliquote dans la culture en croissance exponentielle. Du 2^{ème} au 4^{ème} jour de culture, les densités optiques des suspensions sont comprises entre 0,15 et 0,45 (II.4.1, chap.2). Des prélèvements sont effectués à différentes heures pendant cette phase ; les densités optiques évoluent par incrément de 0,05, par dilution si nécessaire. Pour chaque densité optique, un filtre est chargé avec 20 ml de suspension. Cinq membranes par filtre sont testées en mode batch durant 3 illuminations successives de 1 minute.

DO	0,14	0,21	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45
Amplitude moyenne du signal (UA)	5,6	6,6	8	8,4	9	13,6	18

Tab. 15 : Effet de la charge algale immobilisée sur les membranes (n = 5).

La densité optique choisie est 0,35 ; elle correspond à la fin de la croissance en phase exponentielle, le signal est ample et l'observation au microscope de ces membranes montre une répartition "aérée" des algues, ce qui n'est plus vrai pour les densités optiques supérieures. Pour cette densité optique, chaque membrane porte environ 2,5 millions de cellules.

1.3.2. Influence du cycle d'illumination

La lumière joue un rôle capital car elle représente le "substrat" dans le suivi expérimental des chlorelles. Ce facteur intervient à plusieurs titres : longueur d'onde, intensité de l'éclairement, durée de l'illumination.

On utilise sans modulation la source lumineuse à fibres optiques - Schott® KL 1500 electronic. La lampe halogène de 150 W délivre de la lumière blanche. En puissance maximale, à l'extrémité de la fibre optique, un éclairement de 11 MLx est obtenu d'après les indications du fabricant. L'éclairement que subissent les chlorelles est bien inférieur, mais en raison des conditions opératoires il n'a pu être mesuré. De toute façon, il est affaibli, d'une part, par la double paroi et l'épaisseur d'eau de la cellule de mesure, d'autre part, la membrane algale est placée de façon tangentielle à l'incidence lumineuse pour des raisons pratiques.

Le cycle d'illumination comporte une courte période éclairée (pendant laquelle on mesure la production de O₂) suivie d'une période obscure nécessaire pour revenir aux conditions initiales. Un programmeur électronique commande le fonctionnement de la source lumineuse. Celle-ci est équipée d'un dispositif interne qui compense les variations de régime lors du vieillissement de la lampe ou lors des variations dans l'alimentation. Ces deux points contribuent à la reproductibilité du cycle d'illumination.

Pour optimiser la durée des deux périodes, nous prenons en compte des contraintes :

- d'ordre analytique : la lumière étant le "substrat" de la réaction, l'amplitude du signal dépendra de la durée de l'illumination. De plus, la durée d'un cycle doit être compatible avec la nécessité de réaliser des mesures successives.

- d'ordre physiologique : une illumination insuffisante peut entraîner un stress nutritionnel pour l'algue alors qu'une illumination excessive peut entraîner des atteintes moléculaires par photo-oxydation ou bien stimuler excessivement les réactions métaboliques, gênant le retour aux conditions initiales.

♦ Influence de la durée d'illumination

L'étude est conduite en mode flux pendant 1 heure, la période obscure est fixée à 10 minutes.

Durée Illumination	30 secondes	1 minute	2 minutes
Amplitude moyenne du signal (UA)	4,1	9,0	18,0

Tab. 16 : Influence de la durée de l'illumination, intervalle obscure de 10 minutes (n = 3 membranes - durée expérience 1 heure).

Le flash de 1 minute est un bon compromis pour obtenir un signal ample. Il n'y a aucun abaissement du signal pendant 1 heure.

♦ *Influence de la durée de la période obscure*

La durée de la période obscure peut-elle être inférieure à 10 minutes afin d'augmenter le nombre de mesures possibles en un temps limité ?

La durée d'illumination étant fixée à 1 minute, on teste différentes durées pour la période obscure soit 2 - 5 - 7 - 10 minutes ; 3 membranes sont évaluées pendant 10 cycles. De 5 à 10 minutes, le signal reste inchangé. Pour 2 minutes d'obscurité, on observe un affaiblissement après 5 cycles. Nous choisissons la durée de la période obscure égale à 5 minutes.

Lors de cette étude, nous observons qu'après immobilisation, il est préférable de laisser les membranes en conditions ambiantes au lieu de les placer à l'obscurité avant de les tester.

1.3.3. Répétabilité du biocapteur algal

Une membrane algale est testée pendant 3 heures. Les résultats suivants concernent le mode batch : **n = 20 mesures $\mu = 9,5$ UA CV = 3,7 % $\sigma = 0,31$.**

1.3.4. Reproductibilité du biocapteur algal

Le test est établi sur 10 membranes appartenant à un filtre. Chaque membrane est testée 3 fois dans les conditions habituelles.

On obtient en mode batch : **n = 10 mesures $\mu = 10,8$ UA CV = 9 % $\sigma = 0,9$.**

L'expérience est faite dans la journée, la première membrane est testée 7 heures avant la dixième ; les résultats indiquent qu'une période de latence entre le moment de l'immobilisation et l'utilisation expérimentale de la membrane ne s'impose pas.

Lorsque l'immobilisation est faite sur filtre WCN et non sur filtre GF/C, le CV passe à 20 % ; il y a désorption aux rinçages ainsi que lors de l'utilisation en mode flux. Cette observation a permis de sélectionner le filtre GF/C.

1.3.5. Effet du débit

La pompe péristaltique a une vitesse de rotation fixe, c'est le diamètre des tuyaux Tygon qui détermine alors le débit du milieu circulant.

Débit de circulation du milieu LC (mL.min ⁻¹)	0,6	1,1	3	4	6,2	8,6
Amplitude moyenne du signal (UA)	9,4	9,8	10,2	10,2	15,6	16

Tab. 17 : Amplitude du signal en fonction du débit en mode flux (n = 3).

L'amplitude du signal augmente avec le débit. Pour notre étude, nous choisissons un débit de $1,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ permettant d'optimiser l'amplitude du signal tout en réduisant le volume circulant des solutions toxiques.

1.3.6. Action des produits

1.3.6.1. Action de l'aminotriazole

En batch, l'action est modérément inhibitrice, immédiate et non réversible.

Aminotriazole	% Inhibition
0,01 mM	4,5 %
0,1 mM	7,5 %
1 mM	12 %

Tab. 18 : Inhibition du biocapteur algal utilisé en batch pendant 5 cycles sous l'action de l'aminotriazole, $n=3$.

1.3.6.2. Action du glyphosate

En batch, l'action est inhibitrice mais reste modeste : 27 % d'inhibition après 2 heures d'exposition à une solution de glyphosate à 10 mM. L'effet apparaît immédiatement et progresse au cours du temps, il n'est pas réversible.

La limite de détection après 30 minutes est de $10 \mu\text{M}$.

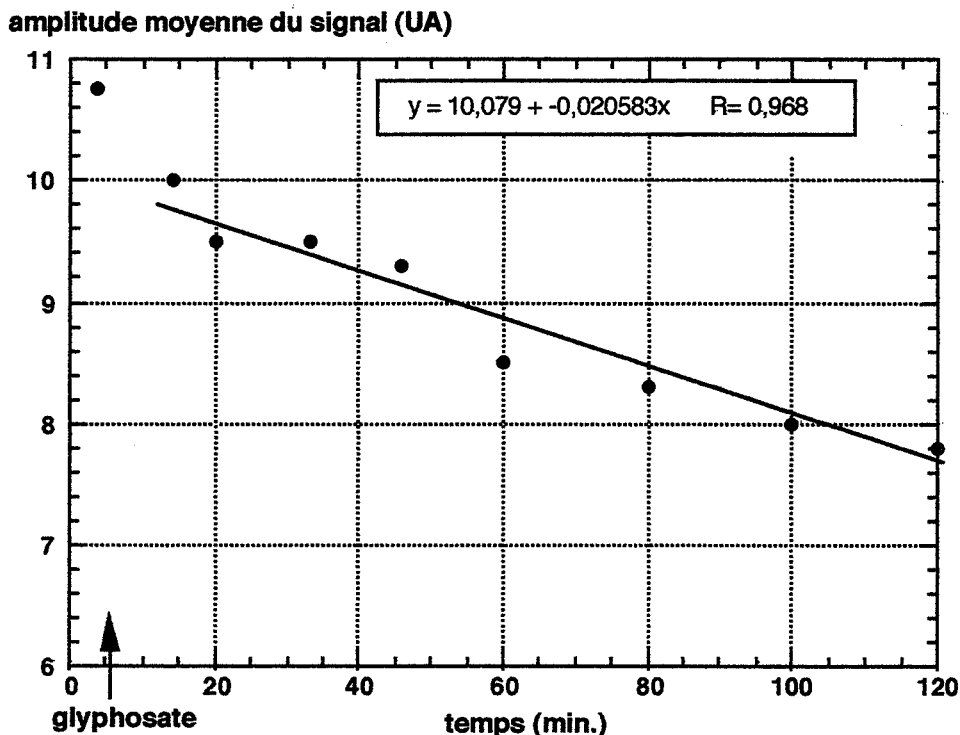


Fig. 16 : Cinétique d'action du glyphosate à 10 mM sur le biocapteur algal utilisé en batch, $n=3$.

1.3.6.3. Action de l'atrazine

L'atrazine est un herbicide anti-PS II, son action inhibitrice est attendue. Quelles sont les caractéristiques de cette action toxique ?

L'étude est conduite en batch et en flux, nous notons un bruit de fond plus important en flux qu'en batch. L'erreur pour les mesures en batch est de 0,6 % et de 2,5 % pour les mesures en flux. La limite de détection correspond à 3,5 % d'inhibition du signal en mode batch et passe à 7,5 % en mode flux.

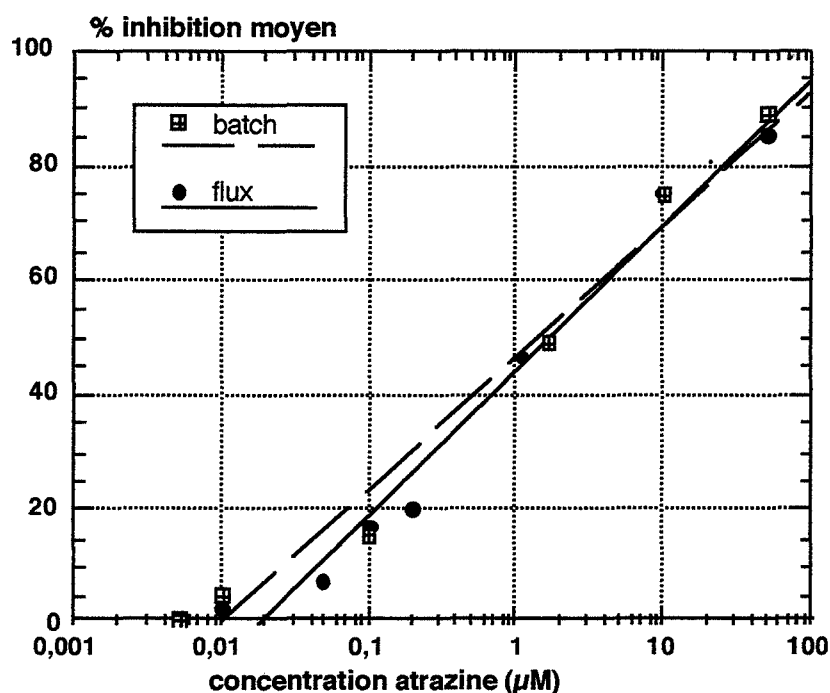


Fig. 17 : Etalonnage de la réponse du biocapteur algal fonctionnant en batch ($R= 0,97$) et en flux ($R=0,98$) en présence de l'atrazine, $n=3$.

L'action est inhibitrice, immédiate et importante sur plusieurs décades de concentration comme le montre la Figure 17. La toxicité du produit est réversible en 15 minutes à 90 % en mode batch, à 100% en mode flux. Le Tableau 19 donne les valeurs-repères :

Atrazine	Batch	Flux
Limite de détection	0,01 μM	0,05 μM
Cl50	1 μM	2 μM
Zone de linéarité	0,01 à 10 μM	0,05 à 20 μM

Tab. 19 : Valeurs-repères dans l'action inhibitrice de l'atrazine sur le biocapteur à chlorelles, $n=3$.

1.3.6.4. Action de la simazine

En batch, l'action est immédiate, inhibitrice, réversible à 90 % après 30 minutes.

La limite de détection est de $0,5 \mu\text{M}$ et la CI_{50} atteint $3 \mu\text{M}$, la courbe d'étalonnage est approximée à une droite en coordonnées semi-logarithmiques avec $R = 0,95$ (Figure 18).

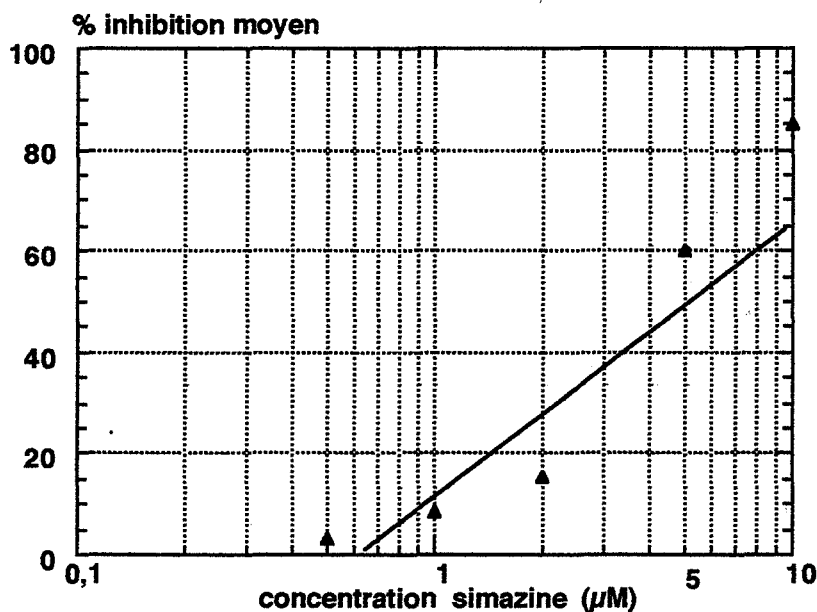


Fig. 18 : Etalonnage de la réponse du biocapteur algal fonctionnant en batch en présence de simazine, $n=3$.

1.3.6.5. Action du diuron

L'action est immédiate, et fortement inhibitrice. Les tests sont conduits en batch et en flux, les remarques faites sur le bruit de fond sont à prendre en considération.

Diuron	Batch	Flux
Limite de détection	$0,01 \mu\text{M}$	$0,02 \mu\text{M}$
CI_{50}	$0,7 \mu\text{M}$	$5 \mu\text{M}$

Tab. 20 : Valeurs-repères dans l'action inhibitrice du diuron sur le biocapteur à chlorelles, $n=3$.

La droite d'étalonnage est obtenue avec $R = 0,96$ sur la gamme de concentrations $0,01 \mu\text{M}$ à $10 \mu\text{M}$.

L'effet toxique de ce produit est totalement réversible en moins de 5 minutes, en mode batch et en mode flux.

1.3.6.6. Action du paraquat

Le paraquat est un produit particulièrement dangereux pour la matière vivante en tant qu'agent peroxydant. Il est en outre utilisé comme herbicide agissant au niveau du PS I (II.2.1, chap.1).

Effectivement le fonctionnement du biocapteur algal est modifié par le paraquat : à partir d'une certaine concentration, la production d'oxygène est diminuée (Figure 19).

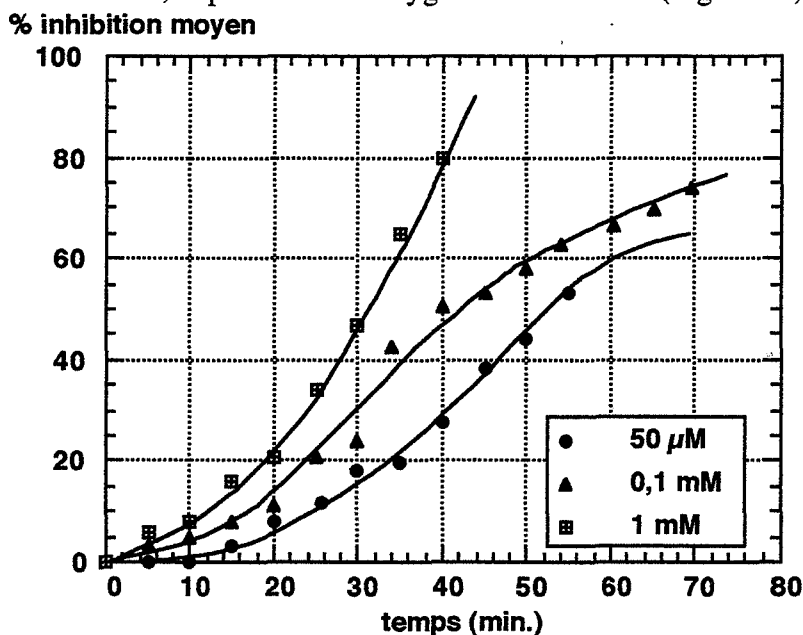


Fig. 19 : Cinétique d'action du paraquat sur le biocapteur algal fonctionnant en batch, n=3.

En batch, la limite de détection se situe à 50 µM, valeur à partir de laquelle l'inhibition se manifeste dès 20 minutes et progresse. Pour 1 mM, l'effet est immédiat ; en revanche, aux faibles concentrations, jusqu'à 10 µM, une augmentation passagère se manifeste avant le retour à l'état initial. Lorsque l'effet toxique a lieu, il est irréversible.

Les résultats concernant la limite de détection sont améliorés d'un facteur 10 par l'usage du biocapteur en mode flux.

1.3.6.7. Action du méthanol

D'après les indications techniques de Bioblock, le tygon, matériau qui constitue les tuyaux souples utilisés dans le montage flux est compatible avec le méthanol de sorte que l'étude est conduite dans les deux modes, avec 5 membranes testées par concentration. Le produit étant particulièrement volatil, nous travaillons sur 3 cycles d'illumination seulement car le montage batch n'est pas complètement étanche.

L'inhibition exercée par des solutions concentrées en méthanol est forte et irréversible. Les pourcentages évoluent au cours du temps dans le sens d'une aggravation. On observe après 15 minutes : pour 1,25 M, le pourcentage d'inhibition est de 65 % et pour 2,5 M, il atteint 75 % d'inhibition du signal.

Pour des solutions diluées et jusqu'à la concentration 0,25 M, le pourcentage d'inhibition est relié linéairement au logarithme de la concentration avec $R = 0,94$ (Figure 20). L'effet toxique se manifeste dès le 1^{er} cycle d'éclairement, il est stable et réversible.

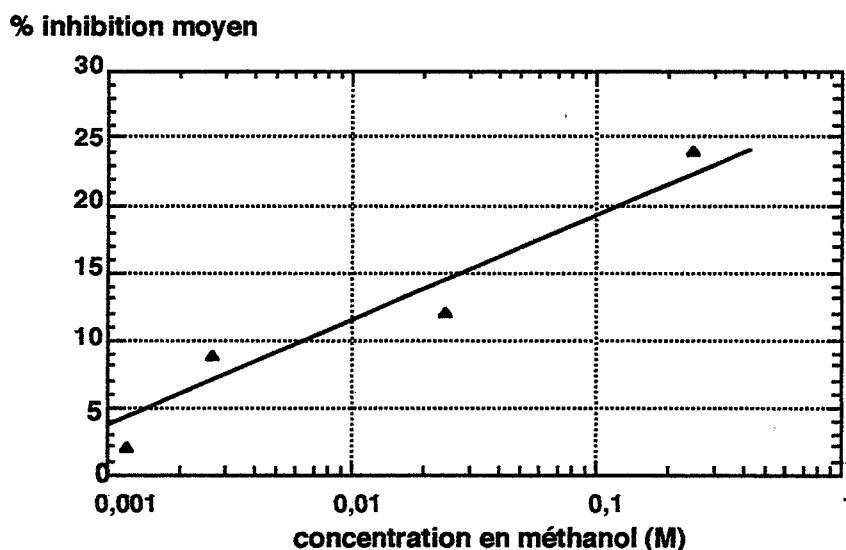


Fig. 20 : Etalonnage de la réponse du biocapteur algal fonctionnant en batch en présence de méthanol, n=5 membranes.

Il existe une différence entre les deux modes, l'effet inhibiteur à concentrations égales est 5 à 10 fois supérieur en batch ; bien que le montage flux soit plus étanche, les résultats pourraient s'expliquer par la non homogénéité de la solution de méthanol.

1.3.6.8. Action du perchloroéthylène

Le produit est très volatil, néanmoins les précautions prises lors de la préparation des solutions et lors des mesures nous permettent de travailler en batch et en flux.

La solubilité du perchloroéthylène est faible soit $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ dans l'eau, aussi avons-nous travaillé sur la gamme de concentrations 0 - $90 \mu\text{M}$.

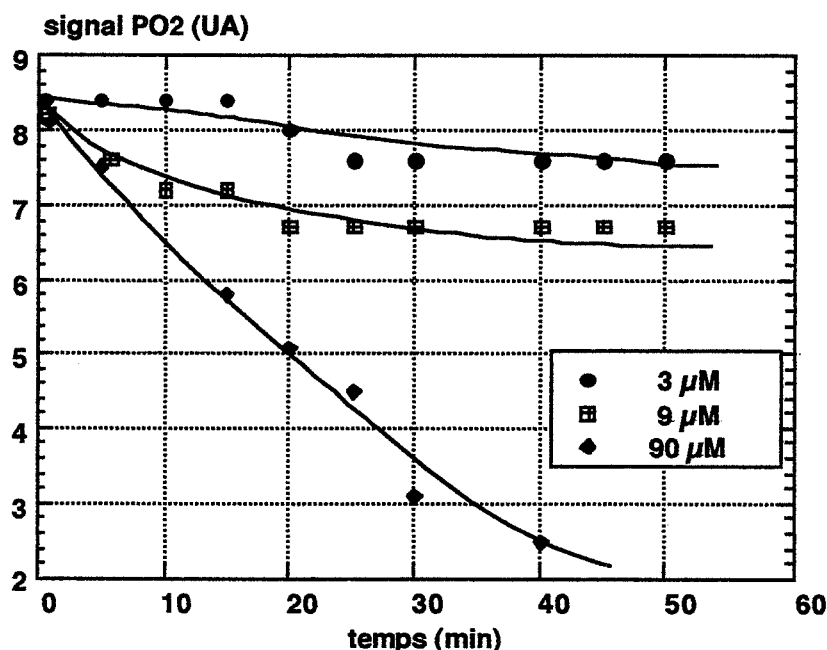


Fig. 21 : Cinétique d'action du perchloroéthylène sur le fonctionnement du biocapteur algal en batch, n=5.

Dès les faibles concentrations, l'effet du perchloroéthylène se manifeste immédiatement. L'inhibition évolue plus ou moins au cours du temps en fonction de la concentration ; elle est plus stable aux plus faibles concentrations comme le montre la Figure 21.

La Figure 22 indique le comportement du biocapteur fonctionnant en mode flux pour la gamme de concentrations 0 - 90 μM . Les résultats sont relevés après 30 minutes.

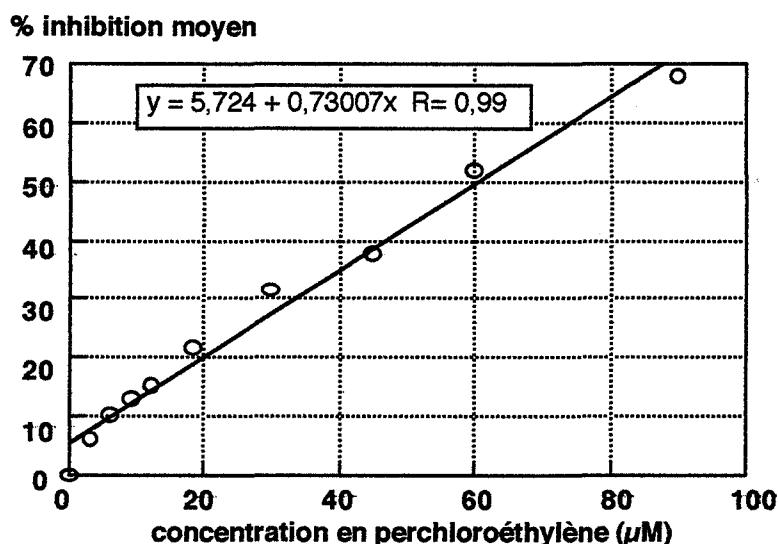


Fig. 22: Etalonnage de la réponse du biocapteur algal fonctionnant en flux sous perchloroéthylène, n=5.

La réversibilité est complète après 1 heure pour des concentrations inférieures à 9 μM .

En batch, les résultats sont un peu différents. La limite de détection est de 18 μM au lieu de 3 μM en flux. Quant à la CI_{50} , après 30 minutes, elle est de 90 μM soit 50 % supérieure à celle obtenue en flux. Les résultats obtenus en batch et en flux sont opposés pour les 2 solvants, cela pourrait s'expliquer par leur différence de solubilité dans l'eau.

1.3.6.9. Action du cadmium et du mercure

Deux essais ponctuels ont été réalisés sans résultat significatif ; il s'agit d'essais en batch avec du chlorure mercurique à 0,04 mM et du nitrate de cadmium à 0,01 mM. Après 1 heure, le % d'inhibition est inférieur à 10 %. Ces résultats confirment ceux obtenus par Pandard (1992) et sont comparables aux valeurs données par Nielsen (1993) et Bozeman (1989).

1.4. Conclusion de l'étude en milieu aqueux

♦ Biocapteur à thylakoïdes

La méthode du dépôt par goutte (spot-wetting) n'assure pas un dépôt uniforme des thylakoïdes, en revanche la méthode par immersion est plus performante du point de vue de la reproductibilité des mesures.

L'adsorption doit être complétée par la réticulation au glutaraldéhyde qui allonge la durée de vie du biocapteur.

La grande sensibilité des thylakoïdes vis-à-vis des herbicides anti-PS II est confirmée. Les résultats sont comparables aux limites de détection d'autres biocapteurs.

Herbicides	Atrazine	Diuron
Limite de détection	0,02 μM (*)	0,06 μM (*)
	0,2 μM (**)	0,02 μM (**)
CI50	0,15 μM (*)	0,9 μM (*)
	2 μM (**)	0,4 μM (**)

Tab. 21 : Caractéristiques de notre biocapteur (*) à thylakoïdes et de celui (**) de Rouillon et al. (1995)

Cependant, les résultats obtenus avec les membranes Pall semblent insuffisants pour envisager une application analytique si ce n'est ponctuelle et en laboratoire.

♦ Biocapteur à micro-algues

La méthode d'immobilisation est satisfaisante car peu traumatisante pour les chlorelles.

Les micro-algues sont sensibles aux herbicides anti-PS II, ici encore les limites de détection sont voisines des limites courantes.

En mode batch	Notre biocapteur	Pandard
Limite de détection	0,01 μM	0,2 μM
CI50	1 μM	1,8 μM

Tab. 22 : Caractéristiques de notre biocapteur à chlorelles et de celui de Pandard (1992), pour l'atrazine.

Le biocapteur algal permet aussi la détection et le dosage d'autres produits tels que le paraquat, le méthanol et le perchloroéthylène.

L'électrode algale ainsi constituée peut être utilisée en batch comme en flux, ses performances métrologiques, sa durée de vie hebdomadaire permettent le suivi des composés toxiques dans l'eau.

♦ Comparaison des deux biocapteurs précédents

La méthode d'immobilisation est spécifique aux biorécepteurs, celle qui convient aux cellules algales n'a pas donné de résultats avec les thylakoïdes. La réussite de l'immobilisation c'est-à-dire l'adéquation entre méthode-support-biorécepteur est le facteur-clé de la réalisation d'un biocapteur performant. Ainsi l'électrode algale apparaît un bien meilleur candidat comme outil analytique utilisable en temps réel sur le terrain. On retrouve ici l'avantage d'avoir une

réponse *in vivo* et un mode de préparation du biocapteur simplifié par rapport au biocapteur à thylakoïdes.

Les algues contiennent des thylakoïdes, on observe en effet des sensibilités comparables pour les 3 herbicides testés en commun. En revanche, parce qu'elles présentent d'autres cibles, les algues permettent aussi de détecter et de doser un spectre plus large de produits.

II. ETUDE EN MILIEU GAZEUX

Deux configurations expérimentales sont conçues, inspirées des conditions d'utilisation des produits. Certains sont liquides et volatils, ils contaminent alors l'atmosphère voisine par leurs vapeurs toxiques ; d'autres sont liquides et utilisés en pulvérisations, ils se retrouvent sous forme d'aérosols dans l'atmosphère de travail. A titre d'exemples, citons :

- le paraquat, herbicide dispersé sous forme d'aérosol,
- le méthanol et le perchloroéthylène, deux solvants industriels utilisés en bains dégraissants qui génèrent des vapeurs, tandis que le perchloroéthylène détachant utilisé dans les pressings se retrouve sous forme d'aérosol lors du séchage dans les machines à laver industrielles.

II.1. Matériel et méthode

II.1.1. Matériel

II.1.1.1. Cellule de mesure des vapeurs toxiques

La Figure 23 présente le dispositif qui permet de tester l'impact des vapeurs sur la réponse du biocapteur ; celui-ci reprend la chaîne de mesure utilisée en milieu aqueux avec un aménagement pour l'introduction du toxique (seringue).

L'électrode algale est positionnée de façon définitive dans la cellule; la solution (S) occupe 1,2 mL et la fraction gazeuse (G) 3,5 mL. La cellule est en contact avec l'atmosphère par un capillaire, elle est par ailleurs thermostatée à 20° C et isolée de la lumière ambiante par une enveloppe en aluminium.

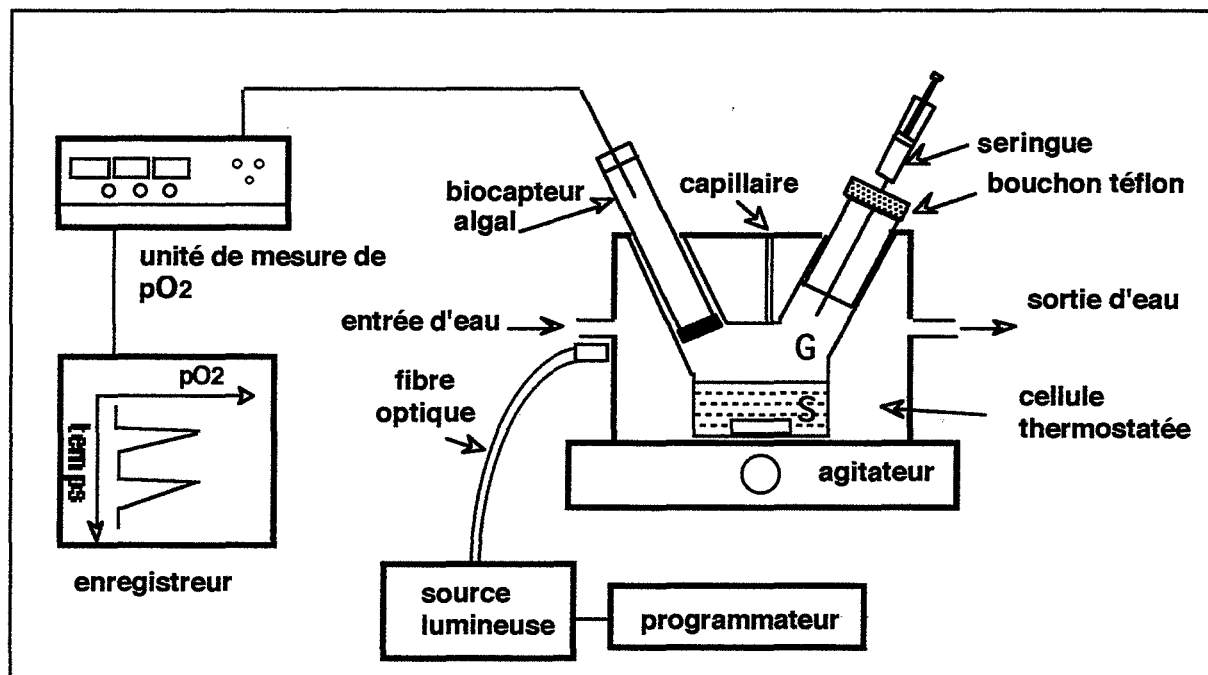


Fig. 23 : Biocapteur algal et système de mesure associé pour le dosage des vapeurs.

II.1.1.2. Enceinte de mesure des aérosols

Comme nous l'avons déjà signalé, l'adjonction d'un système d'humidification évite le dessèchement des éléments sensibles du biocapteur (Figure 24).

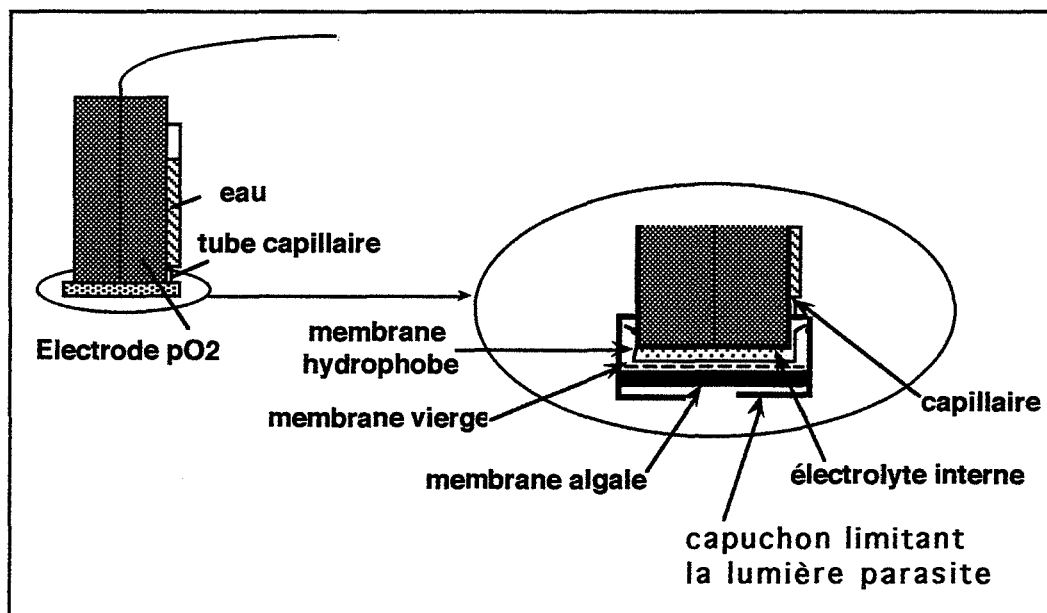


Fig. 24 : Vue détaillée du biocapteur ampérométrique à chlorelles pour le dosage des aérosols toxiques.

Le biocapteur est placé ici dans une enceinte de grand volume dans laquelle est dispersé l'aérosol. En altuglass, de volume 0,7m³, l'enceinte est située dans une salle où température et

pression sont relativement stables. Les parois de l'enceinte sont couvertes de papier aluminium, on effectue un suivi des conditions climatiques à l'intérieur et à l'extérieur de l'enceinte grâce à 2 sondes thermo-hygrométriques. L'enceinte peut être ventilée ou utilisée en atmosphère confinée, elle dispose d'un système d'extraction de l'air, utilisable lorsque le gaz toxique a été introduit et d'un ventilateur mécanique pour homogénéiser l'atmosphère et renouveler l'air au voisinage du biocapteur. Un système de pulvérisation par aérographe est installé à demeure, il distribue un brouillard qui crée l'humidité ambiante et qui servira par la suite à introduire l'aérosol toxique.

Références du matériel nouvellement cité

Sonde thermo-hygrométrique Prolabo

Enceinte 0,7 m³ Jacomex

Vaporisateur à buse Atrium®

Extracteur pour gaine S&P TD- 160/100.

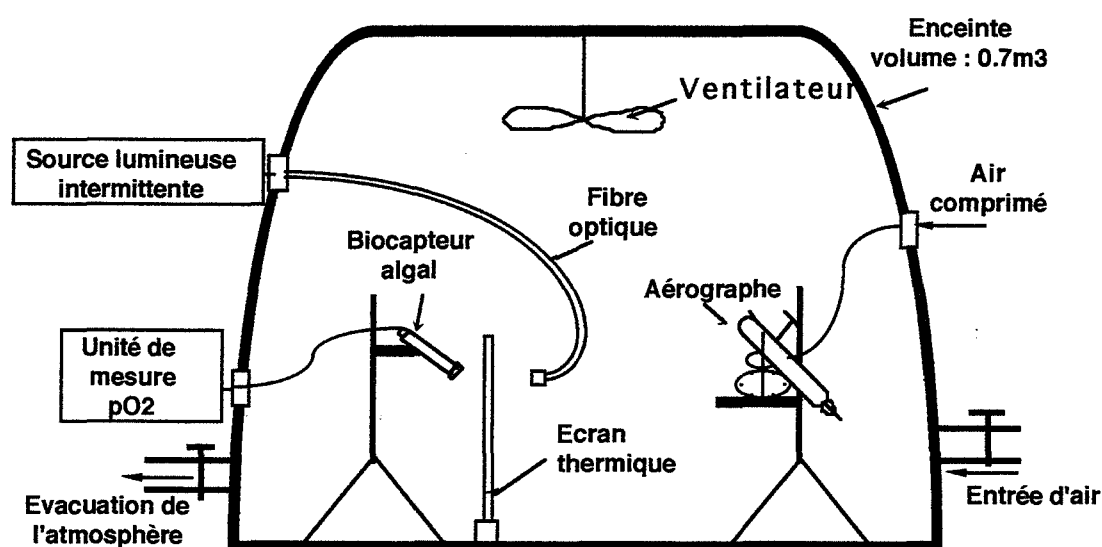


Fig. 25 : Enceinte expérimentale permettant de mesurer l'impact d'un aérosol sur le biocapteur.

II.1.2. Méthode expérimentale

II.1.2.1. Conditions expérimentales

La membrane algale est préparée à partir d'une partie aliquote de 10 mL de DO₇₆₀ = 0,35. Les autres paramètres de l'immobilisation sont habituels (III, chap.2).

Les conditions des mesures sont définies par :

- Pression atmosphérique
- Humidité relative = 75 % en moyenne (de 65 à 90 %) dans l'enceinte, saturée (100%) pour le montage en batch
- Montage maintenu à l'obscurité, le biocapteur est éclairé de façon intermittente (flash de 1 minute suivi de 5 minutes d'obscurité)

- Température = 20 ° C
- Le biocapteur est protégé des infrarouges émis par la lumière du flash grâce à un écran thermique matérialisé par le compartiment eau d'un flacon à double paroi
- Les mesures d'inhibition représentées correspondent chacune à la moyenne obtenue avec 5 membranes.

II.1.2.2. Mode de fonctionnement

♦ *Pour le transducteur*, on observe :

- une réponse plus rapide de l'électrode de pO_2 (< 1min.) par rapport à l'étalonnage en milieu aqueux due à l'absence des couches limites de diffusion dans la phase liquide. La mesure est réalisée sous courant gazeux : air à 20 % O_2 et azote pur.

- un bruit de fond très discret sur la ligne de base due à l'absence de perturbations du milieu liquide en mouvement ; d'autre part, il n'y a pas de rupture chimique lors du montage et démontage du biocapteur, l'environnement physico-chimique de la membrane hydrophobe est plus stable.

♦ *Pour le biocapteur*

Dans les deux configurations, une étape préalable évalue la fiabilité, la répétabilité et la stabilité du biocapteur dans une atmosphère hors toxique servant de référence.

Dans une deuxième étape, le biocapteur est exposé au gaz toxique. Pour le montage en cellule, la solution de référence (eau ou milieu LC) est remplacée par une solution diluée de produit toxique qui est introduite à l'aide de la seringue. La *loi de Henry* permet de quantifier la pression de vapeur au voisinage du biocapteur.

Pour une température et une pression données, la pression de vapeur d'un composé (P) est proportionnelle à la concentration du composé dans la solution (C) :

$$P = H C$$

$$\begin{array}{ll} \text{avec} & H \text{ coefficient de Henry } (\text{atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}) \\ & P \text{ pression de vapeur } (\text{atm}) \\ & C \text{ concentration } (\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}) \end{array}$$

Pour le montage dans l'enceinte, l'atmosphère humide est chargée en aérosol toxique à l'aide de l'aérogaphe. La masse de produit dispersé est exprimée en $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ou en ppm selon l'usage courant.

II.1.3. Produits

On a recours à un herbicide et deux solvants, un chloré et un polaire.

Le Tableau 23 reprend quelques caractéristiques physico-chimiques de ces produits toxiques présentés en annexe (**Annexe 1**).

	Méthanol	Paraquat	Perchloroéthylène
Densité (par rapport à l'eau)	0,79	1,25	1,62
Masse molaire (g)	32,04	257,2	165,85
Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹)	miscible	700	0,15
Coefficient de Henry (atm. m ³ . mole ⁻¹)	1,39 x 10 ⁻⁴	-	1,46 x 10 ⁻²
Tension vapeur sat. (mmHg)	92	-	18
VME (mg.m ³) (ppm)	260 200	0,1 -	335 50

Tab. 23 : Quelques propriétés caractéristiques des produits testés.

II.2. Résultats relatifs au dosage des vapeurs

II.2.1. Etude préalable

Le biocapteur fonctionne de façon satisfaisante en atmosphère confinée, la répétabilité évaluée sur 60 minutes pour 10 mesures donne un CV de 1,1 % ; en atmosphère renouvelée (cellule ouverte par retrait de la seringue), le fonctionnement du biocapteur est relativement stable, la perte de signal est de 20 % après 7 jours.

signal en % valeur initiale

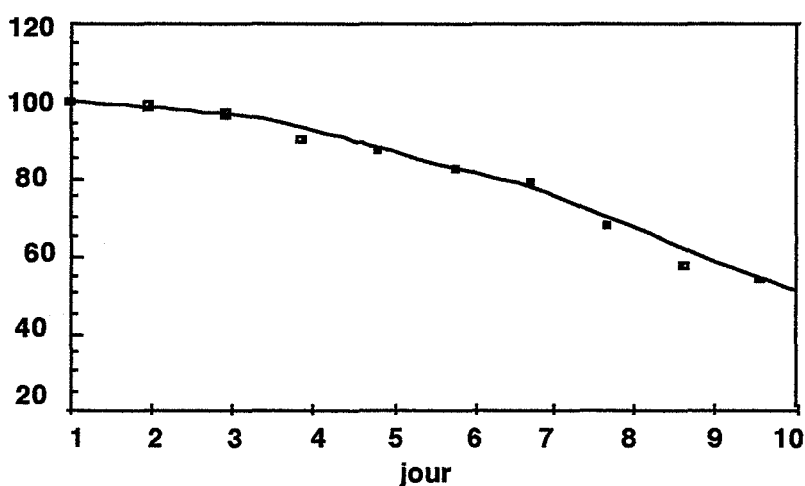


Fig. 26 : Stabilité du biocapteur algal fonctionnant dans la cellule.

II.2.2. Effet des vapeurs de méthanol

En laboratoire, le méthanol est couramment utilisé comme solvant, nous fixons le domaine d'étude en fonction de cet usage : une gamme de dilutions de 0,1 à 10 % v/v est préparée dans l'eau Milli-Q ce qui équivaut à une gamme de concentrations allant de 24,6 mM à 2,46 M.

L'injection de la solution méthanolique est pratiquée à la fin du flash témoin, on observe une réaction immédiate c'est-à-dire une baisse du signal dès le flash suivant. Les résultats sont relevés à 15 minutes, période nécessaire à l'obtention du plateau et valable pour toute la gamme. La réponse du biocapteur est linéaire en coordonnées semi-logarithmiques ($R = 0,99$). Jusqu'à 100 ppm, la réversibilité de l'effet est acquise après 15 minutes de rinçage avec de l'eau. On note que la limite de détection est 40 ppm alors que la CI_{50} est hors de la zone de linéarité à 2750 ppm. Ces résultats sont donnés avec un CV de 10 à 15%.

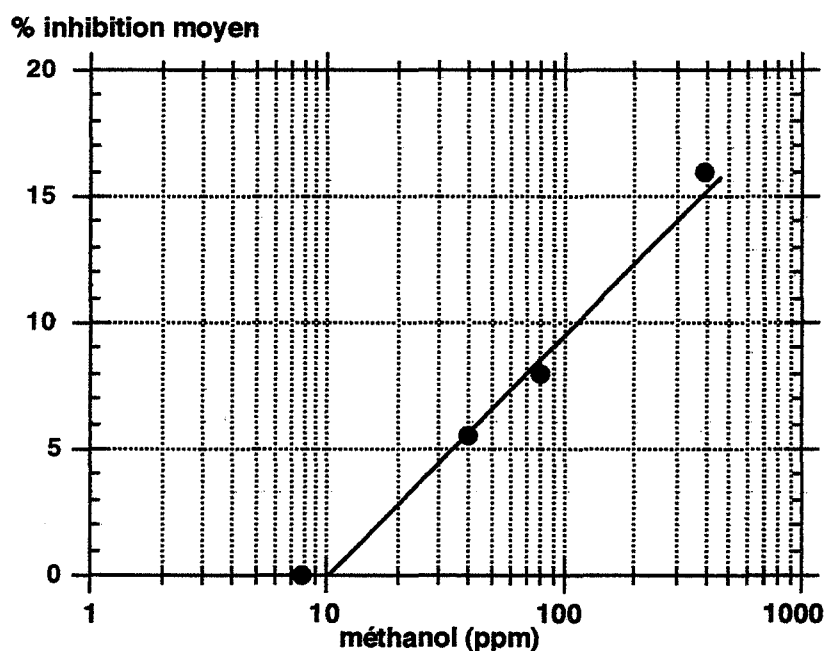


Fig. 27 : Réponse du biocapteur algal en fonction de différentes concentrations de vapeurs de méthanol, $n=5$.

II.2.3. Résultats pour le paraquat et pour le perchloroéthylène

Aucun résultat significatif n'est obtenu avec ces 2 produits testés dans les conditions précédentes ; les raisons sont différentes.

♦ *Cas du paraquat* : On ne détecte pas de variation de signal lorsque le biocapteur est maintenu pendant 2 heures au voisinage d'une solution de paraquat. Comme ce produit est peu volatil, ce montage ne convient pas pour mettre en évidence sa dangerosité.

♦ *Cas du perchloroéthylène* : On enregistre une baisse du signal correspondant à une inhibition de 3 % pour 1000 ppm de perchloroéthylène vapeur. Ce solvant est peu soluble dans l'eau et volatil, de plus, le volume de solution testée est réduit ; pour ces raisons, il est difficile de maintenir l'équilibre thermodynamique pendant la réaction du perchloroéthylène sur les chlorelles. Un montage en phase gazeuse dans une enceinte de volume plus grand nous semble nécessaire.

II.3. Résultats relatifs à l'étude des aérosols

II.3.1. Etude préalable hors toxique

II.3.1.1. Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité du biocapteur

L'expérimentation est conduite en atmosphère contrôlée et confinée.

- Répétabilité : le biocapteur est testé pendant 2 heures avec la même membrane :

$n = 10$ mesures $\mu = 4,64$ UA $CV = 3,35$ % $\sigma = 0,153$.

- Reproductibilité : le biocapteur est testé avec des membranes algales différentes à chaque essai, une membrane est suivie pendant 30 minutes :

$n = 10$ membranes $\mu = 4,83$ UA $CV = 5,4$ % $\sigma = 0,262$.

II.3.1.2. Mesure du temps de réponse

La réaction est instantanée dès l'émission de la lumière, le temps de réponse du biocapteur est inférieure à 10 secondes.

II.3.1.3. Evaluation de la stabilité du biocapteur au cours du temps

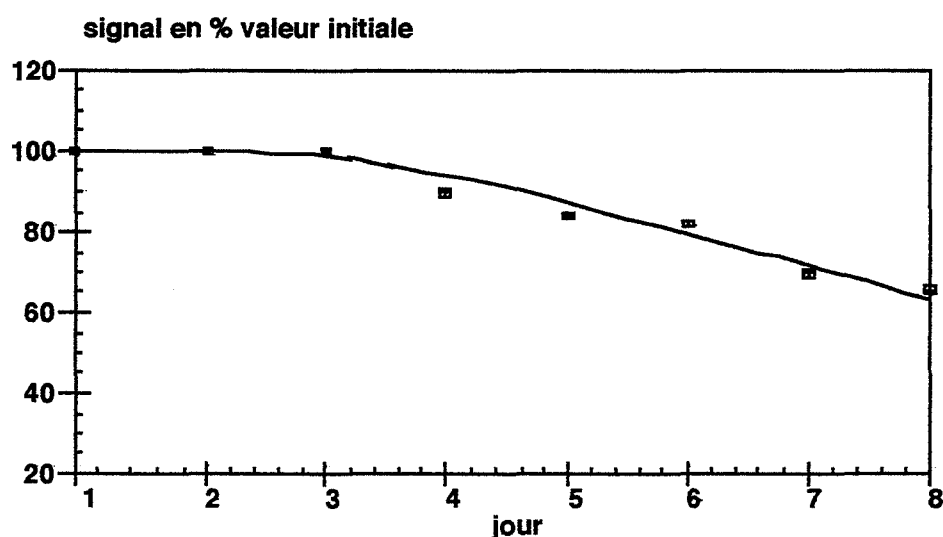


Fig. 28 : Stabilité du biocapteur à chlorelles fonctionnant en continu dans l'enceinte.

Le biocapteur est maintenu pendant 9 jours dans une atmosphère renouvelée, dont l'humidité relative est stabilisée à 85 % ; au bout de 7 jours de fonctionnement continu, jour et nuit, la perte de signal est de 30 % d'après la Figure 28.

Ces résultats nous conduisent à tester le biocapteur en présence de toxiques : le paraquat et le perchloroéthylène.

II.3.2. Réponse du biocapteur à l'aérosol de paraquat

Le paraquat est dispersé sous forme d'aérosol dans l'enceinte ; les résultats sont relevés après 30 minutes de fonctionnement en atmosphère contaminée.

Le pourcentage moyen d'inhibition du signal est de 3,8 % pour 23 ppm de paraquat et passe à 8,5 % pour 230 ppm, pour $n = 2$ membranes.

II.3.3. Comportement du biocapteur à l'aérosol de perchloroéthylène

De petits volumes de perchloroéthylène pur sont pulvérisés à l'aide de l'aérographe.

Non seulement le solvant modifie quantitativement le signal, mais il existe aussi un effet cinétique comme le montre la Figure 29.

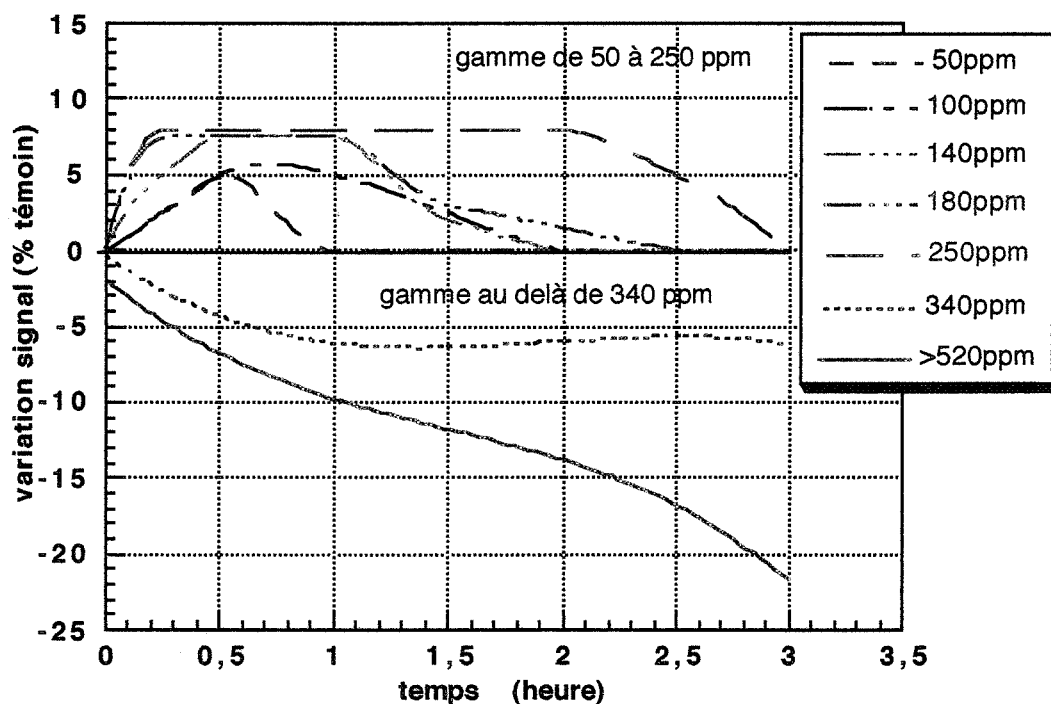


Fig. 29 : Cinétique d'action du perchloroéthylène en aérosol sur le biocapteur algal.

II.4. Conclusion de l'étude en milieu gazeux

Le biocapteur ampérométrique à *Chlorella vulgaris* réagit à des vapeurs et à des aérosols. Comme en milieu aqueux, le biocapteur révèle que les chlorelles sont intoxiquées par le méthanol, le perchloroéthylène et le paraquat.

Les chlorelles sont sensibles aux vapeurs de méthanol et aux aérosols de perchloroéthylène. On note ici que le méthanol est toxique pour de faibles doses et agit très rapidement. Le perchloroéthylène agit lentement. Ces modes d'action rappellent ceux rencontrés en milieu aqueux.

La cellule de mesure convient à la détection du méthanol, l'enceinte est plus adaptée à démontrer la toxicité du paraquat et du perchloroéthylène.

L'étude avec le perchloroéthylène souligne d'ailleurs l'importance des conditions opératoires ; dans la cellule, le biocapteur enregistre la toxicité ressentie par les chlorelles exposées aux vapeurs de perchloroéthylène, alors que dans l'enceinte, l'électrode algale devient un outil analytique permettant de doser le toxique (Figure 30).

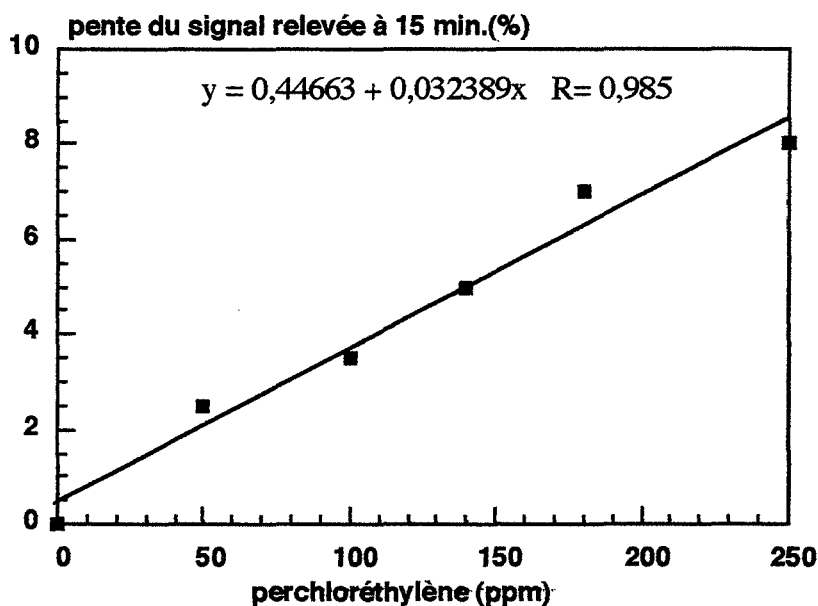


Fig. 30 : Etalonnage du biocapteur algal pour le perchloroéthylène.

En fait, on pourrait concevoir une utilisation conjointe des deux montages.

La cellule servirait davantage à un screening rapide : le produit est-il toxique pour les chlorelles via le transducteur à pO_2 ? En cas de réponse positive, il faudrait alors affiner la gamme de détection et voir si le biocapteur fonctionnant en continu dans l'enceinte permet la surveillance d'un local conformément à la réglementation.

L'enceinte matérialise davantage une situation réelle, nous avons utilisé une dispersion sous forme de micro-gouttelettes, on aurait pu y placer une cuve d'évaporation d'un solvant mais le temps de mise en équilibre serait long en raison du grand volume de l'enceinte.

En ce qui concerne le mode d'action du perchloroéthylène, l'explication de l'effet cinétique visible sur la Figure 29 est physiologique car la volatilité du produit étant forte, on considère que l'aérosol passe instantanément à l'état vapeur.

Pour des concentrations inférieures ou égales à 250 ppm, le signal du biocapteur augmente. On peut émettre l'hypothèse que le métabolisme redox autour du PS II est stimulé sous l'effet du stress. Celui-ci est passager, dépendant de la concentration en perchloroéthylène (Figure 29). Cette perturbation pourrait s'interpréter comme une atteinte structurale modeste plus marquée sur le plan fonctionnel : le flux des protons est activé et indépendant du transfert d'électrons ce qui stimule la production d'oxygène (**Fig.5, chap.2**).

Dans cette gamme de concentrations (0 à 250 ppm), l'électrode algale fonctionne comme un capteur (Figure 30).

Pour des concentrations supérieures ou égales à 340 ppm, les dégâts causés aux structures membranaires ont un impact sur le fonctionnement redox, soit au niveau du PS II, soit en aval avec effet rétrograde irréversible.

Au-delà de 520 ppm, l'effet est très destructeur et indépendant de la concentration.

La réponse de l'électrode algale est un moyen de détection et de dosage du solvant aux concentrations faibles, avant la perception sensorielle du produit (< 100 ppm).

Le comportement du biocapteur révèle une valeur-repère estimée à 300 ppm qui définit une intolérance "vraie" de *Chlorella vulgaris* au perchloroéthylène.

III. CONCLUSION DE L'ETUDE RELATIVE AU BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE

Le biocapteur à chlorelles fonctionne en phase aqueuse et en phase gazeuse. Nous notons dans ce dernier cas l'amélioration des qualités métrologiques du biocapteur : étalonnage rapide, bruit de fond insignifiant, meilleure reproductibilité, durée de vie hebdomadaire.

La préparation et la maintenance sont réduites et peu coûteuses, le biocapteur ne nécessite aucune solution, de type nutriment ou tampon. Il fournit en outre une réponse *in vivo*.

Ce biocapteur, quel que soit le milieu d'étude, peut délivrer un signal en temps réel et en continu sur plusieurs heures.

Le spectre des produits toxiques pour les chlorelles est plus large en milieu aqueux qu'en phase gazeuse. Le biocapteur à micro-algues est un outil analytique : réponse linéaire en fonction de la concentration pour les produits suivants, atrazine, diuron, méthanol, paraquat, perchloroéthylène, simazine. Compte tenu de la réglementation sur la qualité de l'eau et sur les atmosphères des lieux de travail, les performances du capteur semblent intéressantes.

Le dispositif expérimental joue un rôle significatif dans les performances du biocapteur.

CHAPITRE 4

BIOCAPTEUR DE FLUORESCENCE ALGALE A FIBRES OPTIQUES

CHAPITRE 4

BIOCAPTEUR DE FLUORESCENCE ALGALE A FIBRES OPTIQUES

Dans ce chapitre, nous réalisons un nouveau type de biocapteur basé sur la mesure de la fluorescence. Les chlorelles sont immobilisées suivant la méthode que nous avons élaborée et placées à l'extrémité d'un faisceau de fibres optiques relié au fluorimètre.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODE DE MESURE DE LA FLUORESCENCE

Cette partie présente le matériel, le montage mis au point et la méthode de mesure de la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris*.

II. CARACTÉRISTIQUES DU SIGNAL DE FLUORESCENCE

Les caractéristiques du signal délivré par le biocapteur sont décrites.

III. RÉSULTATS

Les performances métrologiques du biocapteur sont évaluées, puis la détection des toxiques est envisagée sous forme de tests monospécifiques, enfin le biocapteur est testé en présence d'un effluent (lixiviat de bois).

AVANT-PROPOS

La surveillance écotoxicologique du milieu aquatique par les méthodes biotechnologiques recourt de façon importante aux micro-algues (1.1.2.1., chap.1). Le bioessai normalisé (ISO T90-304) est un test de toxicité aiguë basé sur l'inhibition de la croissance de *Selenastrum capricornutum*, applicable aux eaux naturelles et aux effluents (1.1.1., chap.1). Actuellement, la recherche privilégie des méthodes d'analyse donnant des résultats rapides et représentatifs de l'impact du produit sur la vitalité des micro-algues : il s'agit de bioessais mesurant la fluorescence chlorophyllienne ou la production d'oxygène photosynthétique. Les mesures s'effectuent sur des suspensions algales, seuls quelques exemples de biocapteurs ampérométriques ont été proposés (1.2., chap.1). Ces méthodes d'analyse s'appliquent essentiellement à la détection des herbicides et des métaux lourds.

Notre méthode d'immobilisation de *Chlorella vulgaris* a montré que l'intégration de ces micro-algues dans un biocapteur électrochimique est possible et permet la détection d'un spectre large de toxiques (chap.3). Nous nous proposons ici d'étudier la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris* immobilisée afin de tester la faisabilité d'un nouveau type de biocapteur.

I. MATERIEL ET METHODE DE MESURE DE LA FLUORESCENCE

I.1. Matériel et montages de mesure de la fluorescence

Les mesures de fluorescence sont effectuées sur des suspensions de chlorelles ou sur des membranes algales associées à un faisceau de fibres optiques (FO).

I.1.1. Dispositifs optiques

Deux spectrofluorimètres sont utilisés successivement.

L'appareil Perkin Elmer (modèle 204) sert pour la majorité des mesures d'inhibition sous toxique. Les signaux sont obtenus sous forme graphique par la sortie enregistreur. Cet appareil est équipé à l'origine d'un support de cuves. Après une 1^{ère} série de mesures réalisées sur des suspensions, nous avons connecté les extrémités du faisceau de fibres optiques sur la sortie source du spectrofluorimètre et sur l'entrée du monochromateur côté détecteur (Figure 31).

L'appareil Spex (Fluorolog-2) propose les deux montages (cuve + fibres optiques) ; il est relié à une unité électronique permettant le stockage des données. Ainsi, avons-nous réalisé des mesures de stabilité du biocapteur dans le temps.

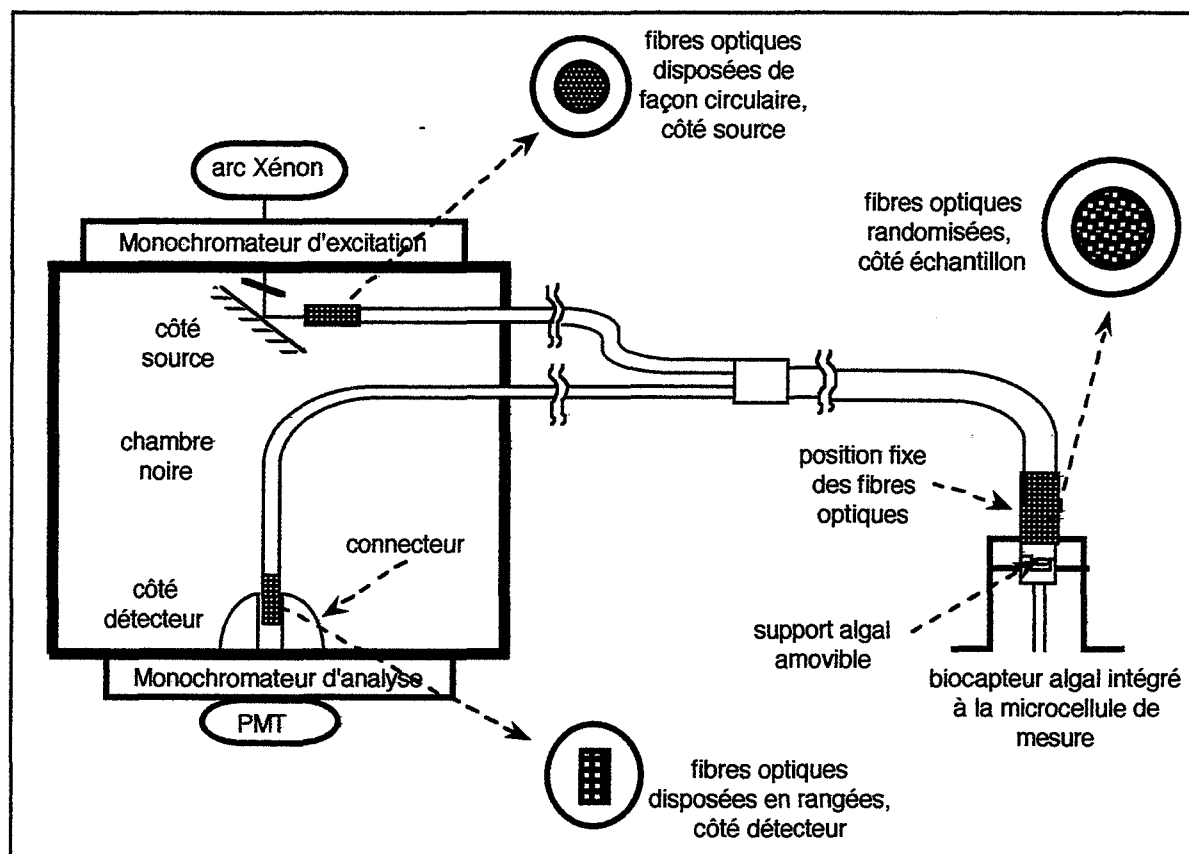


Fig. 31 : Schéma du montage des fibres optiques sur le spectrofluorimètre Perkin Elmer.

Le Tableau 24 présente les caractéristiques techniques des deux appareils.

CARACTERISTIQUES	ELMER PERKIN 204	FLUOROLOG 2 F111X1
Source	arc Xénon 150 W	lampe Xénon 450 W
Monochromateurs excitation + émission	1 réseau, 600 r/mm	1 réseau, 1200 r/mm
Bande passante	fixe 10 nm	réglable (de 0,95 à 18,85 nm)
Détecteur	photomultiplicateur R928 Hamamatsu	
Cuves avec couvercle	quartz Hellma 101 QS (Qz UV Suprasil) et acrylate Elkay Ultra UV SQ	
Fibres optiques groupées en faisceau bifurqué randomisé	Polymicro Technologies PTA-LACO547, FX-047-OJM	Spex
longueur totale	1 m	0,75 m
nature	silice/silice	silice/silice
côté source	271 fibres disposées en cercle, dia. 6,83 mm	fibres disposées en cercle, dia. 3 mm
côté détecteur	276 fibres dans 1 cadre rectangulaire 1,093/2,5 mm	fibres disposées en cercle, dia. 3 mm
côté échantillon	547 fibres randomisées en cercle, dia. 8,4375 mm	fibres randomisées en cercle, dia. 4,5 mm

Tab. 24 : Spécifications des deux spectrofluorimètres associés aux fibres optiques.

1.1.2. Biocapteur de fluorescence algale à fibres optiques

Le faisceau de fibres optiques et le biorécepteur sont intégrés dans un dispositif où circule le milieu échantillon.

La membrane algale représentant le biorécepteur est réalisée comme indiqué précédemment (III, chap.2). Son diamètre est adapté à l'extrémité mixte du faisceau optique, soit environ 1,1 fois le diamètre optique (6 mm).

Le montage du biocapteur est indiqué dans la Figure 32. L'assemblage comprend une cellule en PVC dans laquelle circule le milieu et sur laquelle viennent s'articuler de façon étanche deux pièces démontables :

- vers le haut, dispositif de fixation du faisceau de FO
- vers le bas, dispositif support de la membrane algale.

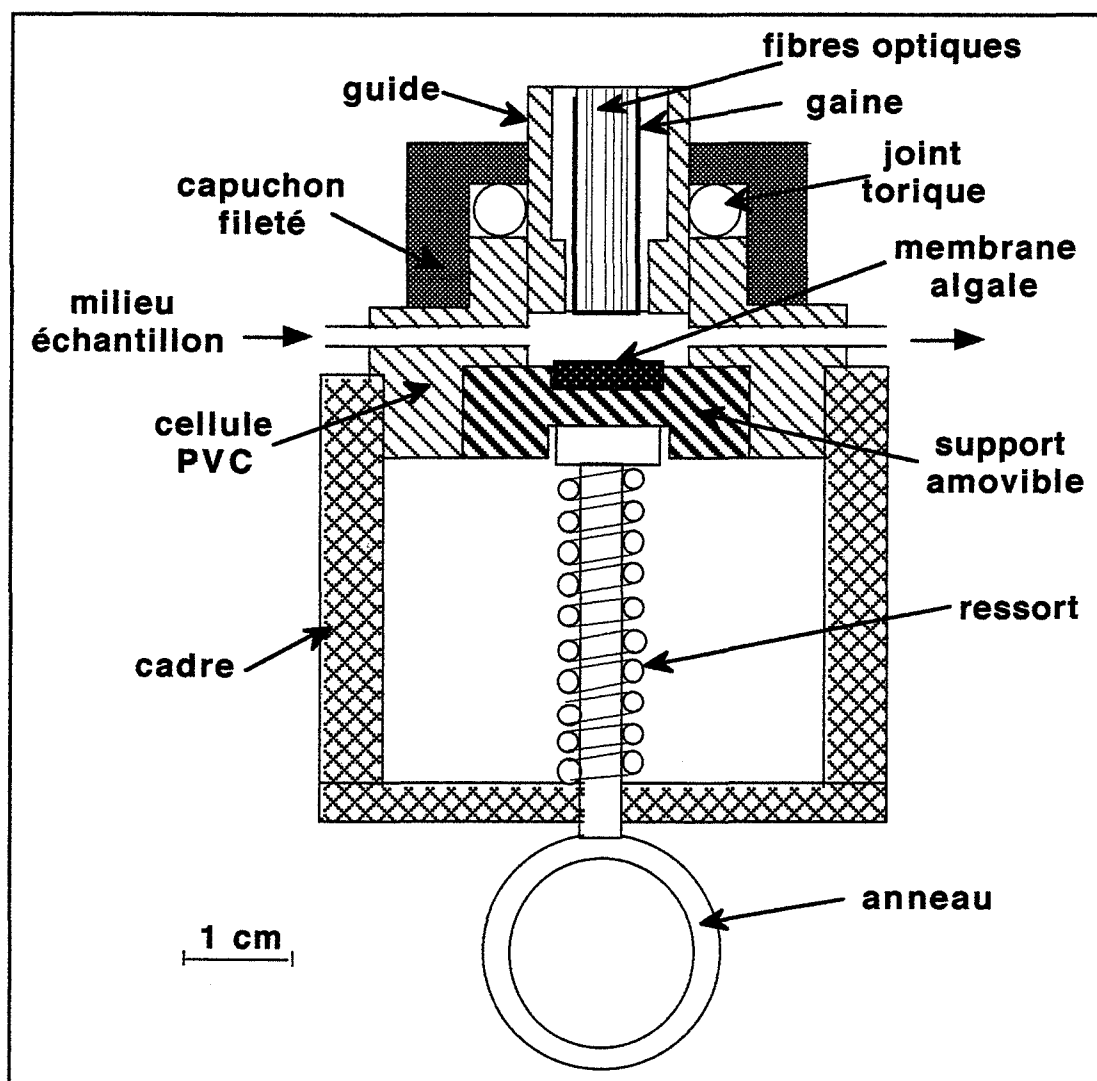


Fig. 32 : Schéma du biocapteur à fibres optiques basé sur la fluorescence algale.

Nous avons choisi de fixer définitivement le faisceau de fibres optiques, alors que le biorécepteur prend place sur la pièce basse facilement accessible et amovible. Cette configuration "dissociée" du biocapteur présente des avantages absents chez le biocapteur monté classiquement : outre une utilisation simple et une mise en place rapide, ici les manipulations

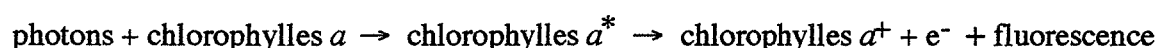
sont réduites permettant gain de temps et meilleure protection des éléments sensibles du biocapteur (finesse des fibres optiques, intégrité de la membrane).

Cette configuration autorise les mesures en mode flux et en mode batch.

1.2. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris*

Activité photosynthétique et fluorescence chlorophyllienne ont été présentées dans le chapitre 2.

La chlorophylle *a* est une molécule biologique très particulière : outre sa capacité à fluorescer, elle possède un processus intrinsèque de quenching. La molécule portée à l'état excité (chlorophylles a^*) par excitation lumineuse restitue une partie de l'énergie en initialisant une réaction de séparation de charge mettant en route le fonctionnement de la chaîne redox, caractéristique de la phase claire de la photosynthèse. Ceci explique que l'émission fluorescente soit faible *in vivo* [Krause et Weiss, 1991].



1.2.1. Détermination des longueurs d'onde expérimentales

L'appareil photosynthétique des algues comprend différents pigments qui collaborent avec les chlorophylles *a* au sein du photosystème II (PS II) ; les pigments de l'antenne collectrice absorbent les radiations électromagnétiques du spectre visible et transfèrent l'énergie aux molécules de chlorophylle *a* des centres réactionnels. A température ambiante, seules les molécules des centres réactionnels du photosystème II fluorescent. Elles émettent à une longueur d'onde voisine de 685 nm (1.4.3.2, chap.2).

1.2.1.1. Choix de la longueur d'onde d'excitation

On recherche le spectre d'excitation correspondant à la longueur d'onde d'émission théorique (685 nm). Le spectre d'excitation est établi avec l'appareil Spex, il présente :

- 2 pics dans le bleu, à 470 et 510 nm
- 1 pic dans le rouge à 645 nm.

L'ensemble des pigments de *Chlorella vulgaris* absorbe dans la partie bleue du spectre visible alors que les chlorophylles sont les seules à absorber les radiations rouges. Les spectres d'émission établis aux deux longueurs d'onde d'excitation 470 nm et 645 nm montrent que le signal est 4 fois plus élevé lorsque l'excitation est portée dans le bleu. En effet, les chlorophylles *b* quantitativement importantes chez les micro-algues ont leur maximum d'absorption vers 470 nm (bande Soret). De plus, le spectre d'émission de la source xénon présente une raie très intense à 470 nm.

Pour ces raisons, nous choisissons la longueur d'onde d'excitation égale à 470 nm. Elle permet de travailler avec un signal de grande amplitude relativement au bruit de fond.

1.2.1.2. Choix de la longueur d'onde d'émission

Compte tenu de la longueur d'onde d'excitation, nous cherchons à optimiser le signal de fluorescence.

Le spectre d'émission est enregistré sur l'intervalle 650 - 700 nm. Le maximum est obtenu à 690 nm, c'est la longueur d'onde d'émission adoptée pour les algues immobilisées. Cette étude est aussi conduite sur des suspensions. Elle permet de vérifier la coïncidence de la longueur d'onde optimale pour les algues immobilisées et pour des suspensions ; un petit écart est observable au niveau de l'émission, on choisit de recueillir la fluorescence à 685 nm pour les suspensions de chlorelles.

1.2.2. Principe de la mesure

Le principe de la mesure repose sur le suivi au cours du temps de la fluorescence chlorophyllienne ; il s'agit donc d'illuminer l'échantillon d'algues avec la source du spectrofluorimètre couplée au monochromateur d'excitation calé à 470 nm, avec une intensité constante, pendant une durée définie exprimée en minutes. On observe alors un signal qui représente la cinétique lente d'induction de la fluorescence chlorophyllienne.

Les produits testés sont, soit des inhibiteurs précoces de la phase lumineuse de la photosynthèse, soit des composés provoquant des destructions des structures membranaires, support des réactions métaboliques. Ainsi, dans le 1^{er} cas, on observe une augmentation de la fluorescence car la chaîne redox étant bloquée par l'inhibiteur, les molécules de chlorophylle ne peuvent se stabiliser que par émission de lumière. Dans le 2^{ème} cas, la destruction de l'architecture membranaire modifie l'environnement moléculaire des chlorophylles, ce qui abaisse les capacités photochimiques et métaboliques, donc la fluorescence diminue [Trémolières, 1998].

1.2.3. Choix du mode de mesure

1.2.3.1. Trois dispositifs possibles de mesure

Trois dispositifs sont envisagés pour les mesures suivant que l'échantillon est liquide ou solide :

- échantillon liquide introduit dans la cuve de mesure de l'appareil de fluorescence
- échantillon solide :
 - * soit placé sur le support porte-objet du fluorimètre
 - * soit utilisé hors du compartiment de mesure, fixé à l'extrémité du faisceau de fibres optiques.

1.2.3.2. Mode liquide avec les suspensions algales

Le signal est faible et il faut renouveler l'échantillon à chaque mesure.

La fluorescence *in vivo* est naturellement faible car seule une partie de la lumière fluorescente entre dans le monochromateur d'émission : il s'agit de la lumière émise à 90° du faisceau incident. De plus, d'autres sources de perte de lumière existent. Au niveau de l'échantillon, les cellules assimilables à des micro-particules peuvent :

- * sédimenter au cours de la mesure (le nombre de cellules recevant le faisceau lumineux incident diminue)
- * engendrer des phénomènes de diffusion lumineuse lors de la réception de la lumière incidente
- * absorber la lumière de la fluorescence émise par les cellules voisines.

L'étude d'optimisation porte d'une part sur la dilution de la suspension pour limiter les phénomènes de réabsorption de lumière émise, d'autre part sur l'emploi d'un "dispersant" pour limiter la sédimentation.

Un prélèvement effectué sur une culture en fin de phase de croissance exponentielle sert à réaliser une gamme de dilutions. Pour chaque dilution, trois échantillons sont préparés. On suit en parallèle la densité optique à 760 nm et la fluorescence à 685 nm sous excitation à 470 nm.

Il existe une relation entre la dilution et la densité optique à 760 nm (DO_{760}) pour le domaine allant de 0,1 à 0,5. La linéarité entre l'intensité de la fluorescence (I_F) et la densité optique de la suspension s'exprime par la droite de régression :

$$I_F = -0,51 + 30,9 \text{ } DO_{760} \text{ avec } R = 0,98.$$

Le seuil de détection des toxiques est d'autant plus bas que l'élément biologique est plus faiblement présent avec un signal significatif. Aux fortes concentrations en cellules, l'instabilité du signal est gênante et la répétabilité est abaissée.

Pour ces raisons, nous n'utiliserons que des solutions très diluées soit une densité optique maximale de 0,25 et minimale de 0,1.

L'utilisation de suspensions très diluées minimise les phénomènes parasites de diffusion et de réabsorption de la lumière fluorescente. Une densité optique de 0,15 semble un compromis acceptable permettant de minimiser les pertes de lumière.

Le polyéthylène glycol (PEG) est un composé à haut poids moléculaire (15000 Daltons), largement utilisé en culture cellulaire. Ici, nous testons l'effet du PEG sur la fluorescence et son efficacité à limiter la sédimentation des algues. Le PEG ne modifie pas de façon significative la fluorescence des algues. Des suspensions d'algues contenant du PEG à 10 % ont été testées. Les résultats après 1 heure et 2 heures donnent les mêmes signaux que les cuves-témoin.

Aucune différence supérieure à 3 % n'a été relevée entre fluorescence témoin et fluorescence sous PEG.

En présence de PEG, la sédimentation est notable après plusieurs heures (dès la deuxième heure) si la cuve n'est pas déplacée ; lors de l'expérimentation, les cuves sont agitées sur table orbitale ou manuellement avant et entre les mesures dans le fluorimètre. La sédimentation pendant une mesure n'a de retentissement que sur la régularité du signal.

En résumé, pour la mesure l'ajout de PEG dans la cuve n'apporte pas d'effets positifs et il ne sera pas utilisé.

1.2.3.3. Mode solide avec les alques immobilisées couplées ou non aux fibres optiques

♦ *Sans fibres optiques*, la membrane est fixée sur l'accessoire porte-objet du fluorimètre Spex. Non protégée, elle est en situation de déshydratation, ce qui limite le temps de mesure et de réutilisation. Il n'est pas possible de faire des mesures en flux.

♦ *Avec fibres optiques*, l'extrémité du faisceau se trouvant à l'extérieur du compartiment de mesure, il est nécessaire d'éliminer la lumière ambiante, on utilise donc la cellule de mesure présentée à la Figure 32. L'expérimentation peut avoir lieu en batch ou en flux.

Nous comparons les signaux émis par une même membrane placée dans les deux situations (avec et sans fibre optique).

Avec le faisceau de fibres optiques, le gain sur l'amplitude du signal s'élève à 32 %. On peut avancer que les pertes dues au trajet optique de la lumière sont préjudiciables à l'utilisation du support porte-objet, alors que les fibres optiques placées à proximité de la membrane récoltent un maximum de lumière fluorescente.

La configuration utilisant les fibres optiques est donc favorable sur le plan des conditions expérimentales pour le biorécepteur et sur le plan de l'obtention du signal.

1.2.4. Optimisation du biocapteur à fibres optiques

Le biocapteur associé aux fibres optiques est utilisable avec les deux fluorimètres (1.1.1, chap.4). Ce qui suit concerne les deux montages expérimentaux.

1.2.4.1. Nature de la membrane d'immobilisation

Les filtres en fibres de verre Whatman® GF/C sont générateurs d'un bruit de fond important pour une excitation à 470 nm ; de plus, leur composition impure est source d'irrégularité. Nous avons alors opté pour des filtres en silice de haute pureté Whatman® QM/A. Un test de reproductibilité sur 30 filtres vierges donne un CV inférieur à 3,5 % et le bruit de fond sous lumière incidente est réduit d'un facteur 20 par rapport aux filtres GF/C.

1.2.4.2. Effet de la charge en algues

Une partie aliquote est prélevée dans le milieu de culture, puis est diluée de manière à obtenir des suspensions algales de densité optique décroissantes, on constitue ainsi une gamme en densité optique allant de 0,1 à 0,5. Des membranes algales sont alors confectionnées à partir des différentes suspensions. Chaque membrane est chargée par filtration de 15 mL de suspension. On enregistre le signal de fluorescence de chaque membrane. Il existe une relation linéaire entre le signal de fluorescence et la charge en algues des membranes. La zone de linéarité concerne l'intervalle 0,1 à 0,35 pour la densité optique. Au-delà, le signal s'affaiblit : les algues plus proches, voire superposées, reçoivent moins de lumière et/ou réabsorbent la lumière de fluorescence de leurs voisines.

Dans la suite, nous choisissons de travailler avec une suspension algale de volume 15 mL et de DO_{760} égale à 0,25. Ceci représente, d'après notre estimation basée sur l'étalonnage DO - nombre de cellules, une population de 2 millions de cellules environ par membrane (**11.4.3, chap.2**).

1.2.4.3. Effet de l'hydratation des membranes

L'eau est un composé structural et métabolique pour l'algue ; la teneur en eau doit être maintenue constante à chaque instant. D'autre part, l'hydratation physique de la membrane constitue une fine pellicule d'eau qui, placée sur le trajet lumineux, peut y apporter des phénomènes de diffraction.

Pour minimiser les effets "variation en eau" les membranes sont maintenues hydratées dans un état saturé.

1.2.4.4. Choix de la largeur des fentes du spectrofluorimètre

Le trajet optique de l'appareil Spex compte quatre fentes en série dont la largeur va de 0,25 mm à 5 mm, ce qui correspond à une bande passante de 0,95 à 18,85 nm.

En général, pour améliorer la résolution, on choisit des fentes fines. Or ici, la variation de fluorescence attendue est d'intensité faible et exprimée par une bande d'émission. Il convient donc d'utiliser des fentes assez larges de manière à capter le maximum de lumière. Par exemple, en doublant la largeur de la fente de 1,25 à 2,5 mm, le signal progresse d'un facteur 18.

La largeur retenue pour les fentes est de 2,5 mm, soit une bande passante de 9,42 nm.

1.2.4.5. Effet de la distance fibres optiques - membrane algale

Etant donné la configuration du biocapteur, il existe un espace entre l'extrémité des fibres optiques et la membrane, espace occupé par le milieu en montage flux ou par l'air en montage batch.

Une même membrane est testée selon les deux montages. La distance doit être optimisée en fonction du milieu : en montage flux (interface eau), la distance est de l'ordre de 3 mm ; elle doit être plus grande, de l'ordre de 5 mm, en montage batch (interface air).

Ce paramètre est indépendant du type de fluorimètre.

II. CARACTERISTIQUES DU SIGNAL DE FLUORESCENCE

II.1. Cinétique lente d'induction de la fluorescence

La fluorescence est une émission instantanée en réponse à une excitation lumineuse. Ici le phénomène fluorescent se prolonge avec l'illumination. Les fluorimètres utilisés permettent de suivre la cinétique lente de la fluorescence c'est-à-dire l'émission qui suit celle présentée au (I.4.3.2, chap.2).

Le signal typique recueilli sur l'écran du moniteur ou sur l'enregistreur est présenté dans la Figure 33. Après 3 minutes, le tracé se stabilise à un niveau constant ; on choisit de relever la mesure à 5 minutes. Ce signal est pris comme référence, on l'appelle signal témoin : il correspond dans les conditions expérimentales choisies au fonctionnement physiologique de référence de *Chlorella vulgaris*. Il dépend des conditions de culture et de la conservation de la membrane algale.

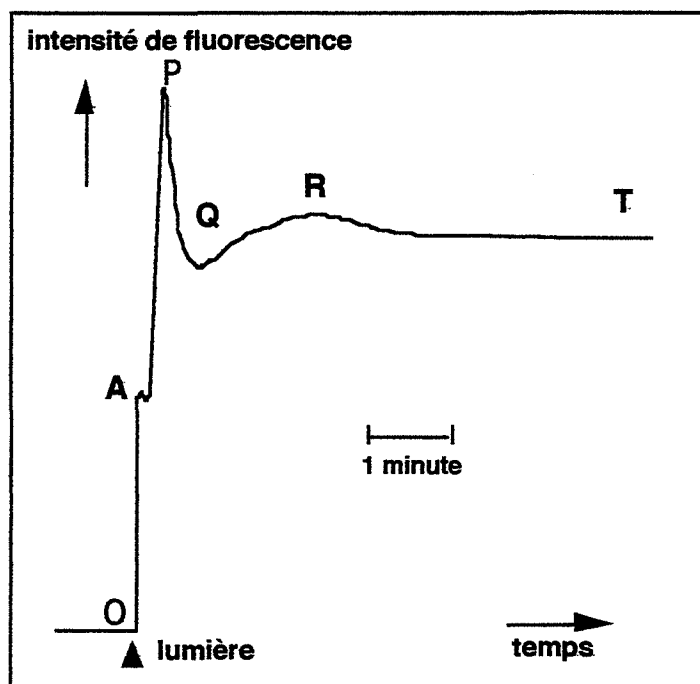


Fig. 33 : Signal expérimental de la cinétique lente d'induction de la fluorescence.

Le tracé peut s'interpréter ainsi d'après les indications du chapitre 2 (I.4, chap.2) :

- **phase OP** : à l'application du flash, la chlorophylle fluoresce, la hauteur de P est constante pour le matériel et des conditions opératoires fixes. L'inflexion au niveau A indique l'implication du pool des plastoquinones, en P, la réduction des quinones est totale.

- **phase PQ** : la mise en service du système redox du PS I permet la réoxydation du pool des plastoquinones, l'excitation lumineuse est convertie d'une part en fluorescence, d'autre part en réactions d'oxydo-réduction. Le signal de fluorescence s'affaiblit.

- **phase QRT** : un régime stationnaire s'établit par la mise en jeu des réactions de phosphorylation (QR) et par la mise en route de la deuxième phase de la photosynthèse (RT). C'est l'intensité de la fluorescence au niveau T qui sera choisie comme amplitude du signal stabilisé.

II.2. Contexte physiologique et conditions pré-opératoires

Chez les chlorelles, la fluorescence chlorophyllienne ne constitue qu'une des réponses physiologiques à l'excitation lumineuse des pigments. Etant donné l'interdépendance des différents types de réponse, il importe de définir clairement les conditions opératoires de manière à optimiser le signal pris comme référence. Celui-ci doit être ample, stable, fiable et reproductible.

La lumière intervient qualitativement par la nature de la longueur d'onde d'excitation et quantitativement par l'intensité et la durée d'éclairement. Les longueurs d'onde ont été optimisées précédemment (1.2.1, chap.4) : longueur d'onde excitatrice, 470 nm et longueur d'onde d'émission, 690 nm.

Sur le plan quantitatif seul le paramètre durée est étudié. L'intensité délivrée par les sources des spectrofluorimètres n'est pas modifiée. *En conditions pré-opératoires*, les échantillons sont conservés soit à l'obscurité totale, soit à la lumière ambiante atténuée. *Lors des mesures*, l'échantillon est soumis à un éclaircissement vif et court (1 ou 2 ou 5 minutes).

Après 15 minutes d'obscurité totale, le signal de fluorescence est conforme au signal témoin (Figure 33). En deçà de 15 minutes, le signal au niveau T diminue faiblement pour un éclaircissement de 1 à 2 minutes, régulièrement et notablement (perte de 15 à 20 %) pour un éclaircissement de 5 minutes. On observe également dans ces conditions la disparition du pic P.

La situation pré-opératoire simple qui consiste à laisser l'échantillon à la lumière ambiante atténuée conduit à un tracé proche du signal témoin (même amplitude pour T mais effacement du pic P) ; la stabilité diminue au cours du temps, après 5 mesures.

En définitive, pour des mesures ponctuelles, en particulier dans le cas des suspensions, les algues sont laissées à la lumière ambiante atténuée. Pour des mesures répétées ou sur de longues périodes, en présence de produits photo-sensibles, nous opérons avec l'obscurité préalable de 15 minutes ; dans tous les cas, le flash excitateur est de 1 minute pour limiter le temps de mesure.

II.3. Effet de la température

Ce paramètre est déterminant en tant que facteur climatique : il est très variable d'un lieu à un autre, d'un jour à l'autre ; d'autre part, il influence les réactions chimiques.

Les algues sont cultivées à 22° C. Deux solutions sont possibles, soit acclimater les algues à la température de l'échantillon avant la mesure, soit conserver la température de la culture et réguler à 22° C la température du prélèvement. La 1^{ère} éventualité est envisageable si la fluorescence est peu modifiée par la température.

La gamme de température s'étend de 10° C à 35° C (intervalle de 5° C). Au-delà et en deçà, les conditions ne sont pas compatibles avec les conditions vitales et sont peu représentées dans le milieu naturel. Les conditions expérimentales se définissent ainsi :

- suspension algale de DO₇₆₀ égale à 0,25
- incubation minimale de 30 minutes à la température test (précision du bain thermostatique égale à 0,1° C)
- obscurité préalable de 15 minutes, illumination de 1 minute
- pH de l'échantillon égal à 7.

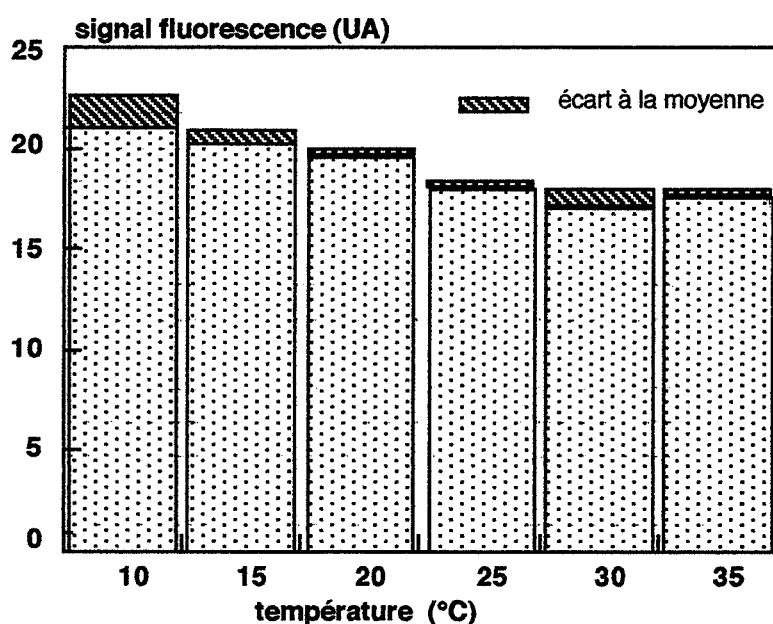


Fig. 34 : Effet de la température sur la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris*.

L'effet de la température se traduit par une modification du tracé (effacement du pic P) et de l'amplitude du signal au niveau T défini à la Figure 33. Le domaine le plus favorable pour le suivi de la fluorescence de la chlorophylle des chlorelles va de 15° C à 25° C (Figure 34). En effet, à 10°C, l'écart à la moyenne est élevé (1,5) ; on peut estimer que les modifications de l'amplitude et de l'allure du signal sont dues moins à une modification pigmentaire qu'à un dysfonctionnement en aval des centres réactionnels. Au-delà de 25°C, le signal s'affaiblit et à

35° C, son allure n'est plus physiologique : la disparition du pic P indique une altération fonctionnelle des protéines relevant d'une altération structurale.

L'étude montre que si la température de l'échantillon est comprise entre 15° C et 25° C, la mesure peut avoir lieu directement sans acclimatation des algues.

La température expérimentale retenue est de 20° C.

II.4. Effet du pH de l'échantillon de mesure

En biotechnologie, l'utilisation de micro-organismes impose de travailler dans un domaine de pH limité pour optimiser les conditions vitales ; ceci constitue une contrainte importante car ce paramètre fluctue pendant les réactions métaboliques ; ici, nous sommes en présence d'une mesure de fluorescence, phénomène physique beaucoup moins sensible au pH. Néanmoins, les échantillons à tester peuvent présenter des pH divers, aussi sommes-nous confrontés à la question de l'effet pH.

Un prélèvement est réalisé comme précédemment (II.3, chap.4). Par centrifugation (10 000 g, 5 min.), les cellules sont isolées du surnageant . Une gamme allant de pH 5,5 à 8,5 (intervalle de 0,5) est préparée par ajout de NaOH ou de HCl dans le milieu LC. On expose les algues pendant 1 heure aux différents pH. Les densités optiques des suspensions sont ajustées à 0,25, donc prêtes à l'emploi pour la mesure de fluorescence.

Le signal reste physiologique sur la gamme d'étude (Figure 35).

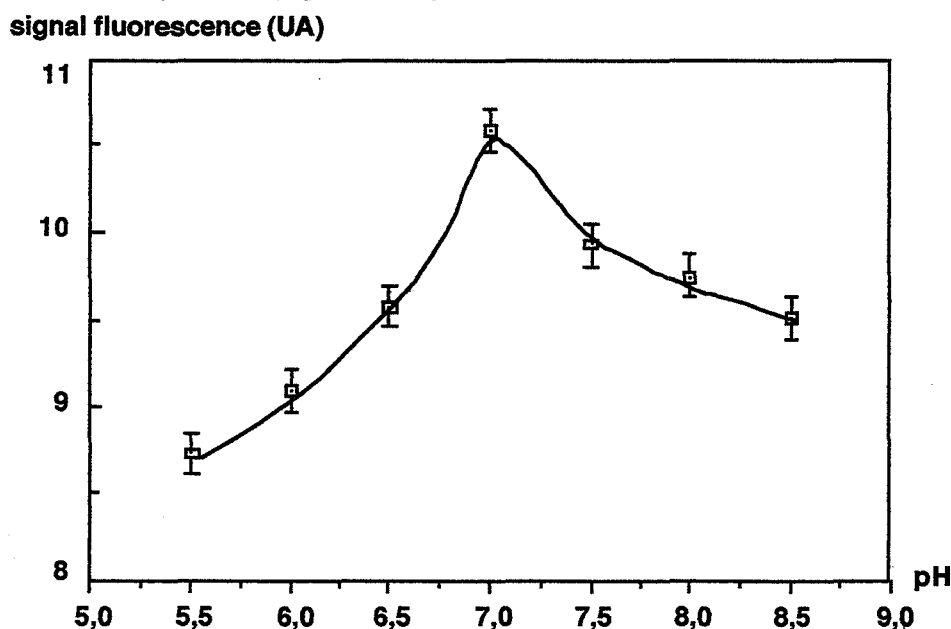


Fig. 35 : Effet du pH sur la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris*.

Chez les chlorelles, le signal est optimal à pH 7. Lorsque le pH varie de 6,5 à 8,5, on constate une diminution du signal inférieure à 10 % et en deçà de pH 6,5, la diminution reste inférieure à 15 %, ceci, que les chlorelles soient acclimatées ou non.

Les chlorelles sont très tolérantes vis-à-vis du pH, la valeur retenue est de 7.

II.5. Conditions opératoires pour un signal optimisé

L'expérimentation a lieu dans les conditions suivantes :

- suspension algale en fin de croissance exponentielle de DO_{760} égale à :
 - 0,15, pour les mesures en mode suspension
 - 0,25 pour les mesures en mode immobilisé sur filtre QM/A Whatman® QM/A à raison de 15 ml de suspension pour un diamètre de 4,7 mm
- obscurité préalable de 15 minutes, suivie d'une illumination de 1 minute
- pH de l'échantillon : 7
- température : 20° C
- en mode immobilisé, mesures en batch et en flux, la circulation du milieu échantillon est assurée par la pompe péristaltique référencée au chapitre 3 (I.1.1, chap.3). Le débit est 1,1 mL.min⁻¹.

III. RESULTATS

La réponse du biocapteur permet d'évaluer l'impact de différents produits sur la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris* ; deux types de tests sont effectués :

- test monospécifique : le produit est dissous dans de l'eau Milli-Q (II.2.2, chap.1)
- test avec un milieu naturel complexe, ici un lixiviat de bois.

Pour les tests monospécifiques, une étude comparative est conduite en mode suspension et en mode immobilisé. Préalablement à l'étude de toxicité aiguë, nous évaluons les propriétés des signaux de fluorescence émis par les suspensions et les membranes algales.

III.1. Stabilité du signal fluorimétrique

Une membrane algale est testée toutes les 30 minutes sur une durée de 6 heures ; la mesure de fluorescence est faite :

- en batch, la membrane est conservée en dehors de la cellule entre les mesures
- en flux, la membrane reste en place dans la cellule.

On obtient le signal témoin (Figure 33) avec la constance du tracé PRT (profil et amplitude). Il en est de même pour les suspensions.

III.2. Répétabilité et reproductibilité des mesures

Les résultats concernent le biocapteur algal testé en mode batch avec le spectrofluorimètre Perkin-Elmer.

La *répétabilité* est évaluée sur une membrane soumise à des mesures pendant 3 heures. La moyenne des 10 mesures est de 12,5 UA avec un écart-type de 0,22 et un CV de 1,92 %.

La *reproductibilité* des signaux de fluorescence est évaluée dans les contextes suivants.

♦ *Reproductibilité intra-filtre* : elle est mesurée avec **12** membranes appartenant à **un** seul filtre. La moyenne obtenue pour le lot des 12 membranes est 12,85 UA avec un écart-type de 0,23 et un CV de 3,3 %.

♦ *Reproductibilité intra-lot* : à partir d'**un** seul prélèvement dans le milieu de culture, **3** filtres sont chargés, **5** membranes découpées dans chacun servent à l'évaluation de la reproductibilité ; ici la reproductibilité d'un lot de membranes algales est recherchée. On obtient pour $n = 15$, un CV de 3,5 %.

♦ *Reproductibilité inter-lots* : pour surveiller au cours du temps le comportement de la souche, une opération semblable est réalisée sur des prélèvements provenant de repiquages successifs ; sur une durée de **2 mois**, 5 membranes appartenant à 3 filtres sont testées, soit $n = 15$, le CV est de 4,9 %.

♦ *Reproductibilité manipulative* : un **expérimentateur** formé au protocole réalise l'immobilisation, puis les mesures fluorimétriques ; 4 filtres fournissent chacun 3 membranes.

Expérimentateur X $n = 12$ $m = 11,75$ UA $\sigma = 0,375$ CV = 3,2 %

Expérimentateur Y $n = 12$ $m = 11$ UA $\sigma = 0,2$ CV = 4,18 %.

La facilité du mode opératoire le rend parfaitement accessible à un expérimentateur entraîné mais non spécialiste.

Le biocapteur de fluorescence algale présente une répétabilité et une reproductibilité qui permettent d'envisager l'étude de toxicité.

III.3. Tests de toxicité monospécifiques

III.3.1. Limite de détection comparée des suspensions algales et du biocapteur à fibres optiques

L'expérimentation avec toxique a lieu selon les deux montages en conditions optimisées, le paramètre "lumière" est identique. Pour chaque essai, trois membranes sont testées dans les mêmes conditions.

Le Tableau 25 récapitule les résultats significatifs concernant la détection de deux triazines et d'un sel métallique en mode batch.

TOXIQUE	SUSPENSION	BIOCAPTEUR
ATRAZINE	0,2 μ M	0,01 μ M
DIURON	0,2 μ M	0,1 nM
MERCURE (chlorure)	5 μ M	0,1 μ M

Tab. 25 : Limites de détection obtenues par mesure fluorimétrique, sur des suspensions de chlorelles et avec le biocapteur algal à FO, après 30 minutes d'incubation, n=3.

Le biocapteur permet d'abaisser la limite de détection des composés toxiques testés par rapport aux mesures de fluorescence classiques : d'un facteur 20 pour l'atrazine, d'un facteur 50 pour le sel mercurique enfin d'un facteur 2000 pour le diuron.

En écotoxicologie, le recours à la mesure de la fluorescence chlorophyllienne sur des suspensions algales est souvent utilisé mais souffre d'une limite de détection trop forte [Samson, 1988 ; Conrad et al., 1993]. Etant donné l'amélioration dans la détection que procure l'utilisation du biocapteur, dans la suite nous privilégions ce type de montage.

L'annexe (**Annexe 6**) récapitule les résultats obtenus pour les différents toxiques testés sur les suspensions de chlorelles. Ces résultats confirment la forte toxicité exercée par les herbicides anti-PS II et complètent la liste des composés toxiques pour les chlorelles.

III.3.2. Réponse du biocapteur algal à fibres optiques en mode batch

III.3.2.1. Echantillon déposé sur la membrane sous forme de goutte

Les résultats sont obtenus en mode batch par dépôt d'une goutte, soit 20 μ l de solution toxique, sur la membrane algale. Le Tableau 26 donne la limite de détection, la CI_{50} ou CE_{50} et la réversibilité de l'effet du toxique.

Par réversibilité, on entend le retour à la valeur initiale du signal lorsque la solution toxique a été éliminée par 3 lavages de la membrane. La réversibilité est évaluée sur des membranes dans le milieu LC pour une exposition 10 fois supérieure à la limite de détection. Compte-tenu d'une période obscure de 15 minutes précédant la mesure, la réversibilité est immédiate si elle est observée dès la première mesure, la récupération n'est plus attendue au delà de 1 heure. Elle est considérée comme totale si la récupération atteint au moins 95 % du signal initial.

Les données du Tableau 26, comparées à celles de l'annexe (**Annexe 6**) montrent que les résultats sont particulièrement intéressants pour les herbicides anti-PS II, il y a moins d'écart

pour les autres toxiques, cependant le temps de réaction est toujours plus court avec le biocapteur.

Toxique	Limite de détection	CE50 ou CI50	Réversibilité
atrazine	0,01 μM	0,7 μM	oui, immédiate
simazine	0,01 μM	5 μM	oui, immédiate
diuron	0,1 nM	0,01 μM	oui, immédiate
alachlor	0,01 mM	2,5 mM	non
glyphosate	2 mM	53 mM	non
aminotriazole	5 mM	nd	non
paraquat	0,05 mM	nd	non
cadmium (nitrate)	0,1 mM	nd	nd
mercure (chlorure)	0,1 μM	1 mM	non

Tab. 26 : Valeurs repères pour différents toxiques établies avec le biocapteur de fluorescence algale à fibres optiques, n=3 membranes.
(nd : non déterminé)

III.3.2.2. Membrane algale immergée dans l'échantillon

Le fait de limiter le volume de solution test à 20 μL a-t-il un impact sur la sensibilité du biocapteur ?

On procède par immersion : la membrane est déposée dans un volume de 5 mL de solution toxique ; le nombre d'analytes disponibles est bien plus grand malgré une concentration identique ; l'agitation permet aussi de réduire les couches-limites de diffusion.

Pour l'aminotriazole, après 1 heure à la concentration millimolaire, l'immersion amène une augmentation de la fluorescence de 27 % au lieu de 8 % obtenue par dépôt d'une goutte.

Pour le diuron et l'atrazine, les pourcentages de stimulation de la fluorescence sous immersion et exposition ponctuelle sont récapitulés dans la Figure 36.

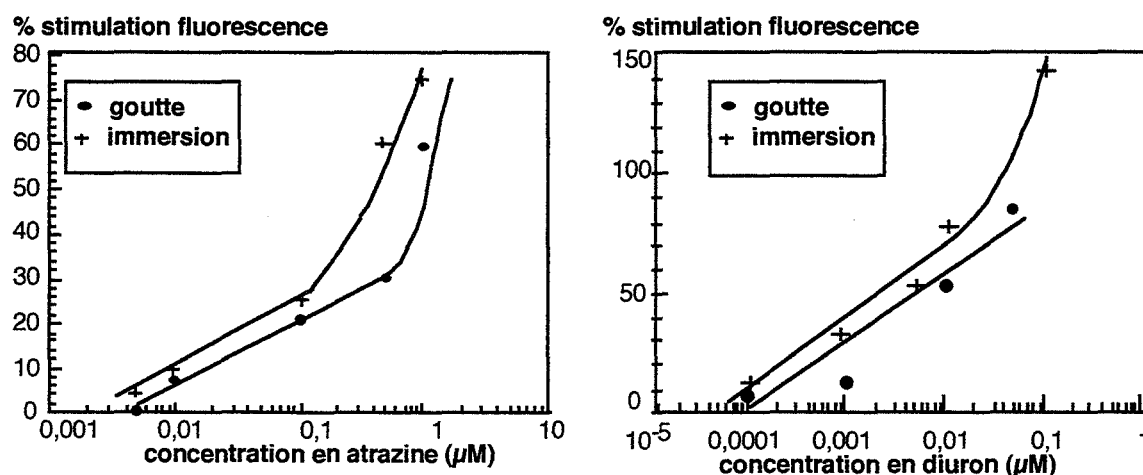


Fig. 36 : Comparaison des réponses du biocapteur en présence d'atrazine et de diuron pour les 2 modes : dépôt d'une goutte et immersion, n=3 membranes.

Pour des temps d'incubation identiques (5 minutes), l'effet du toxique s'exprime toujours plus fortement sous immersion.

III.3.3. Réponse du biocapteur algal à fibres optiques en mode flux

Le biocapteur est alimenté en continu par un flux délivré par une pompe péristaltique. L'alimentation, grâce à un tube en Y, apporte alternativement le milieu LC et le milieu test. Des essais sont effectués en présence de quatre toxiques. On observe :

- ♦ *un signal semblable à celui obtenu en mode batch (II.1, chap.4)*
- ♦ *un abaissement de la limite de détection de chaque toxique testé*

TOXIQUE	"GOUTTE"	FLUX
Atrazine	0,01 μ M	5 nM
Alachlor	0,01 mM	5 μ M
Glyphosate	2 mM	0,1 mM
Simazine	0,01 μ M	1 nM

Tab. 27 : Limites de détection obtenues par un biocapteur à fibres optiques, en mode batch et en mode flux.

Le mode dynamique se révèle ainsi plus approprié à la surveillance en continu des herbicides.

- ♦ *l'amélioration de la reproductibilité des mesures*

Pour l'atrazine ($n = 5$), la limite de détection est obtenue avec CV = 1,9 % au lieu de 3,2 % en batch.

Il n'y a pas de désorption des algues sous l'action du flux, une mesure de DO₆₈₅ pratiquée sur le liquide sortant de la cellule de mesure donne une valeur insignifiante (<0,01). Les performances du biocapteur sont améliorées : le fonctionnement en flux est possible au vu de ces résultats.

III.3.4. Etude du mécanisme d'action d'un toxique, le paraquat

Le paraquat, produit phytosanitaire, présente un mécanisme d'action bien connu sur la photosynthèse : il inhibe une étape car son potentiel redox lui permet de jouer le rôle d'accepteur d'électrons terminal en fin de chaîne photosynthétique au niveau de la ferrédoxine ; la réduction du NADP⁺, plus tard la fixation du CO₂ ne peuvent avoir lieu (I.4.2.4, chap.2).

Le paraquat est aussi dangereux car il produirait des lipoperoxydations au sein de la matière vivante. Il est démontré que ces peroxydations dans le cas du paraquat sont initiées et leurs effets renforcés par l'excitation des molécules de chlorophylles et par la présence d'oxygène [Scalla, 1991]. Or, dans le métabolisme étudié, la production d'oxygène est liée à

l'application de la lumière. Nous avons voulu savoir si la lumière potentialisait l'effet néfaste du paraquat et s'il existait une incidence sur la détection du produit.

Dans ce but, deux lots de membranes algales sont exposés à des solutions de paraquat (gamme allant de $1\ \mu\text{M}$ à $1\ \text{mM}$, un lot comprend 3 membranes par concentration).

Le premier lot est testé dans les conditions habituelles en respectant 15 minutes d'obscurité avant la mesure alors que le deuxième lot est illuminé pendant 2 minutes, puis mis à l'obscurité pendant 13 minutes avant la mesure, pour respecter une même durée d'incubation en présence de toxique. Un lot témoin permet de vérifier que les 2 minutes d'illumination n'ont pas d'effet négatif même à long terme.

La Figure 37 montre la cinétique d'action des solutions de paraquat respectivement à l'obscurité totale et avec une illumination préalable.

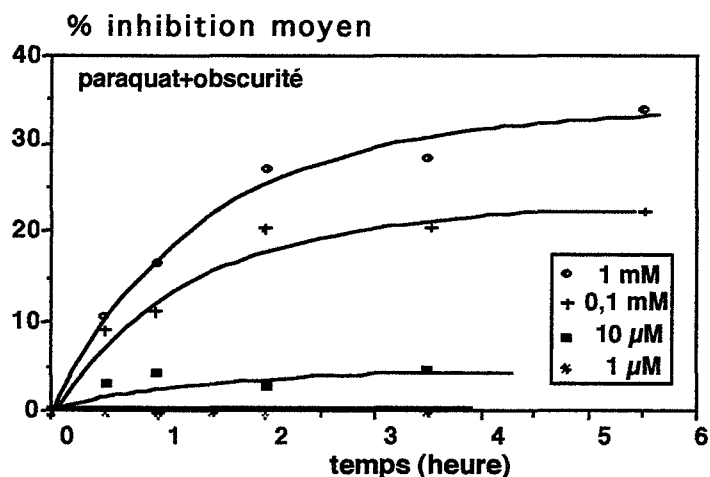


Fig. 37-a : Réponse du biocapteur de fluorescence algale en présence de paraquat *sans* illumination préalable.

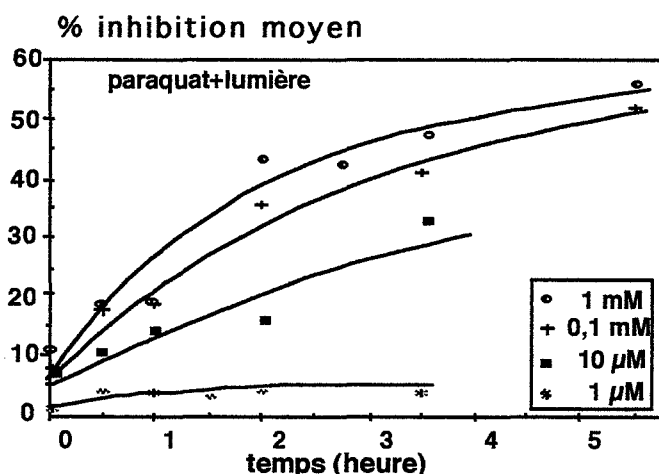


Fig. 37-b : Réponse du biocapteur de fluorescence algale en présence de paraquat *avec* illumination préalable.

Nous observons une amélioration de la détection dans le deuxième cas, la concentration micro-molaire est en effet inefficace en cas d'obscurité. Pour les concentrations supérieures,

l'effet toxique tend à se stabiliser au delà de deux heures en conditions obscures alors qu'il ne cesse de progresser s'il y a eu illumination.

En définitive, il semble que la lumière accentue les dégradations provoquées par le paraquat chez *Chlorella vulgaris*. Cet effet plaide en faveur d'une action prédominante des peroxydations aux dépens du shunt électronique.

III.4. Conservation du biocapteur à fibres optiques hors usage

Les deux éléments du biocapteur sont aisément séparables (I.1.2, chap.4). En dehors des périodes d'utilisation, il s'agit de préserver l'activité des membranes algales, par contre, la partie optique ne nécessite pas d'entretien. En atmosphère ambiante, les facteurs vitaux pour les algues sont l'eau et la lumière. Plusieurs solutions sont envisagées.

III.4.1. Utilisation sur une période courte mais discontinue

Les membranes doivent être rapidement fonctionnelles. On choisit alors de ne pas faire varier le facteur eau, les membranes seront conservées dans des boîtes en milieu saturé.

Les conditions lumineuses de la culture autorisent une croissance sur le support, en effet après 5 jours, on observe un renforcement de la couleur verte de la membrane et le signal a évolué : d'abord dans le sens d'une augmentation de la fluorescence jusqu'au troisième jour, puis il diminue, vraisemblablement le nombre de cellules a trop augmenté.

Une deuxième expérimentation consiste à laisser les membranes algales à lumière ambiante atténuée (zone la moins éclairée de la salle d'expérience).

♦ *Un lot de membranes est conservé ainsi pendant 15 jours, une membrane est testée quotidiennement en mode batch.*

1 ^{ère} semaine	n = 6	$\mu = 15,6$ UA	CV = 2,9 %
2 ^{ème} semaine	n = 7	$\mu = 16,8$ UA	CV = 5 %.

♦ *On réitère l'expérimentation sur une période de 7 semaines (3 filtres confectionnés simultanément sont nécessaires).*

1 ^{ère} semaine	n = 6	$\mu = 15,6$ UA	CV = 2,9 %
2 ^{ème} semaine	n = 7	$\mu = 16,8$ UA	CV = 5 %
3 ^{ème} semaine	n = 5	$\mu = 14,2$ UA	CV = 9 %
4 ^{ème} semaine	n = 5	$\mu = 12,8$ UA	CV = 10,2 %
5 ^{ème} semaine	n = 4	$\mu = 12$ UA	CV = 12 %
6 ^{ème} semaine	n = 4	$\mu = 9,8$ UA	CV = 8,5 %
7 ^{ème} semaine	n = 4	$\mu = 6,4$ UA	CV = 13 %.

Les résultats montrent une relative constance du signal que l'on peut interpréter par une situation équilibrée du point de vue de la population algale ; à partir de la 4^{ème} semaine, la perte

du signal progresse de 20 à 30 %. En lumière atténuée, la croissance est réduite et la conservation sur une période courte est possible.

III.4.2. Conservation sur une longue durée

Est-il possible de stocker les membranes, voire les chlorelles, sur une période longue (> 2 mois) ?

Les travaux de Santarius (1990) sur les thylakoïdes et les essais de Pandard (1992) ont montré la grande sensibilité des éléments photosynthétiques vis-à-vis du froid et de la déshydratation. Prenant en compte ces résultats, nous choisissons la conservation dans des boîtes hermétiques, à 4° C et à l'obscurité. A l'expiration du délai, les chlorelles sont réacclimatées aux conditions expérimentales.

♦ *Des membranes algales* sont conservées ainsi pendant un an.

A l'expiration du délai, la réacclimatation débute par une réhydratation ménagée puis les membranes sont mises en conditions ambiantes : 20° C et lumière du jour. A partir du quatrième jour, les mesures de fluorescence sont réalisées : le signal est de l'ordre du signal témoin pour 10 membranes sur 15 (CV = 17 %) ; 5 membranes émettent un signal de fluorescence résiduel ou non physiologique.

♦ *Des suspensions* sont conservées de la même façon pendant un et deux ans.

En fin de période de conservation, le surnageant est remplacé par du milieu LC frais sous agitation douce puis les suspensions algales sont placées en conditions ambiantes. L'acclimatation est plus rapide (2 jours) ; l'aspect microscopique des chlorelles est normal. On procède alors à l'immobilisation, puis aux mesures. Les chlorelles stockées pendant 1 an produisent un signal de fluorescence de l'ordre du signal témoin, variation maximale de 20 %. Après 2 ans de conservation, 50 % des membranes issues de ces suspensions ne donnent pas de signal significatif. Pour les autres membranes, on note une perte de 50 % par rapport au niveau témoin.

III.5. Comportement du biocapteur à fibres optiques fonctionnant en continu

L'alimentation du biocapteur par un flux ne pose pas de problème pour les mesures brèves. Qu'en est-il sur une période longue ?

Le test dure deux semaines, le biocapteur est soumis à un flux renouvelé de milieu LC (débit 1,1 mL) ; l'illumination est maintenue pendant 2 minutes toutes les 10 minutes. Après 7 jours, la perte de signal est de 5 %, elle atteint 30 % après 15 jours (Figure 38).

Des contrôles effectués sur les solutions à la sortie de la cellule de mesure ont révélé une densité optique cumulée de 0,05 à 685 nm. La diminution de la réponse du biocapteur au cours du temps provient davantage d'une baisse d'activité des algues que d'une désorption.

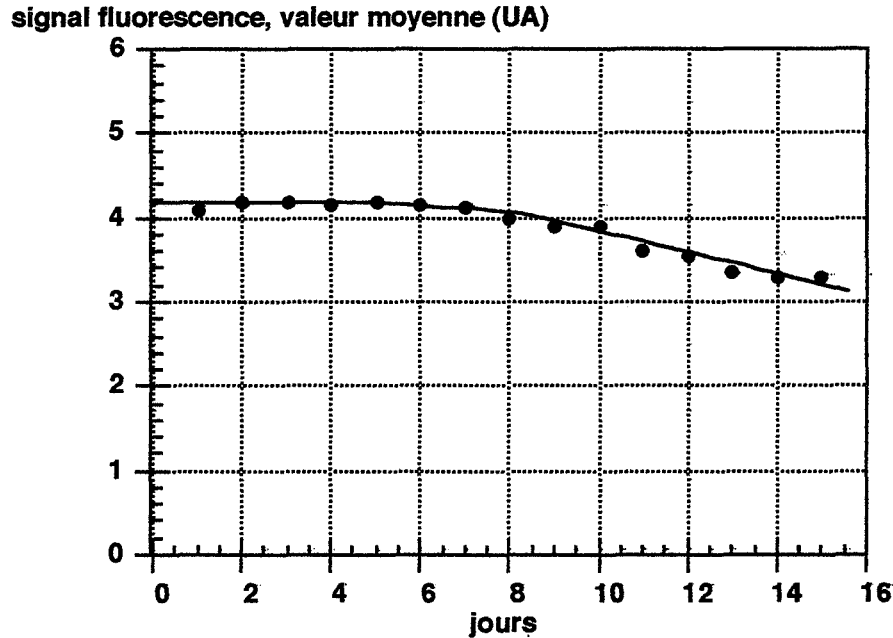


Fig. 38 : Fonctionnement en continu pendant 15 jours du biocapteur de fluorescence algale.

III.6. Comportement du biocapteur de fluorescence algale en milieu complexe

Le biocapteur a démontré son aptitude à détecter des toxiques lors de tests de laboratoire (le milieu vital est contaminé par *un* produit toxique) ; dans ces conditions, il paraît intéressant de le soumettre à une situation réelle, forcément plus complexe.

Nous choisissons des lixiviats de bois naturels et traités.

III.6.1. Description des milieux

Le bois est un matériau naturel largement utilisé dans la construction et l'habitat. En tant que bio-composite, il présente des inconvénients (putréfaction, variations dimensionnelles...) auxquels il convient de remédier. Actuellement deux types de traitement existent :

- le traitement chimique par imprégnation, les sels métalliques (Cu, Cr, As) et des composés phénoliques (pentachlorophénol) sont les plus couramment utilisés
- le traitement thermique à basse température sous atmosphère inerte ; cette réification a été mise au point à l'ENSM-SE [Armines, 1986].

Nous utilisons deux essences : le pin, *Pinus sylvestris*, le sapin, *Abies alba*. Trois types de bois sont testés, le bois naturel et le bois traité selon les deux méthodes.

Les lixiviats de bois sont obtenus par lessivage à température ambiante, conformément à la norme Afnor X31-210 de décembre 1992. Les échantillons de bois sont réduits en petits fragments (tamis de 4 mm), lessivés dans de l'eau Milli RO (pH 5,2) sous agitation, pendant 24 heures, le milieu de lixiviation est alors filtré (porosité 0,45 μm).

Cette méthode préparatoire simule :

- un lessivage "naturel" par les eaux de pluie : conditions naturelles de l'écosystème forestier ou du parc de stockage d'une scierie
- la lixiviation qui génère des effluents en sortie d'une usine de traitement du bois, une usine de papier, une menuiserie.

Les lixiviats sont des solutions complexes, de composition chimique non clairement élucidée, mais *a priori* elles renferment [Kai, 1991] :

♦ **des molécules organiques** d'origine végétale :

- les extractibles naturels représentés par les tanins, les polyphénols, les terpènes, les tropolones ; ces composés spécifiques de l'essence ont des propriétés anti-microbiennes, fongicides notamment.
- les extractibles secondaires, dérivés tissulaires issus de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine. Ces composés sont libérés lors du traitement sous l'action de la chaleur et/ou de la pression, ils présentent des variations notables d'une essence à l'autre. Dans la réтификаtion des résineux, les extractibles secondaires renferment du furfural, de l'acide acétique, du méthanol.

♦ **des composés minéraux** d'origine végétale et/ou en provenance du traitement chimique.

L'observation microscopique et les tests Gram effectués sur des lixiviats conservés ne révèlent pas de contaminants bactériens, ni de mycélium.

Les spectres, d'absorption dans le visible et de fluorescence, montrent des similitudes pour les trois types de lixiviats : les pics se situent aux mêmes longueurs d'onde ; en revanche, l'intensité de ces pics différencie bois naturel et bois traités. Les pics d'absorption et d'émission de ces trois types de lixiviats n'interfèrent pas avec les longueurs d'onde nécessaires à l'usage du biocapteur algal.

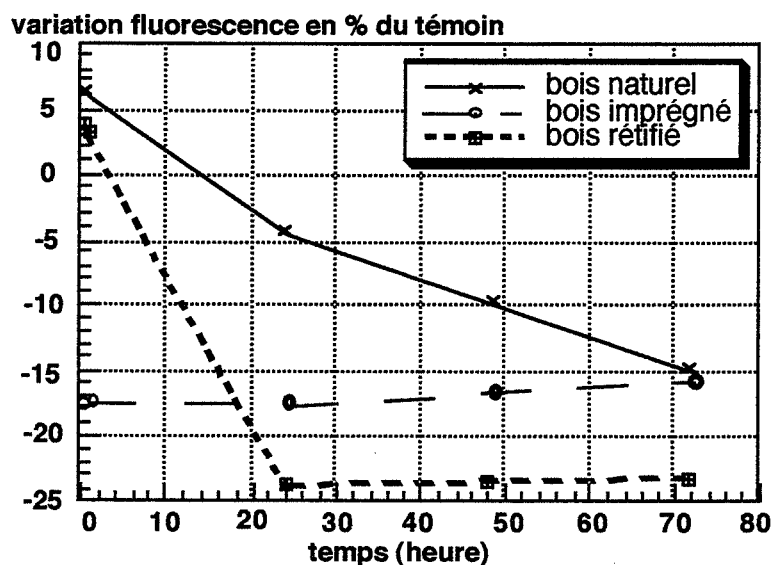
Des caractéristiques des lixiviats de pin et de sapin sont présentées en annexe (**Annexe 7**). On retient leur nette acidité.

III.6.2. Etude expérimentale

III.6.2.1. Les lixiviats de pin

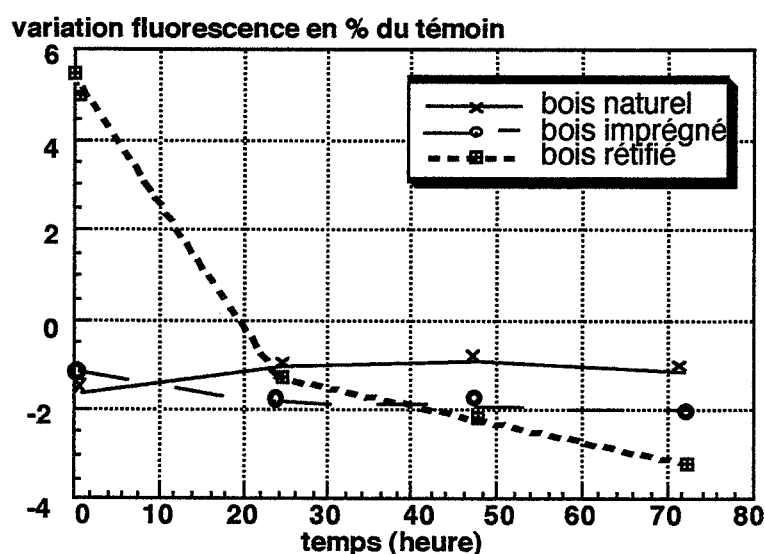
♦ Mesures en mode batch :

Chaque membrane algale subit une période d'incubation dans le lixiviat allant de 15 minutes à 72 heures, le milieu est renouvelé si nécessaire toutes les 24 heures, à raison de 3 mL pour 15 membranes. Les membranes sont maintenues à l'obscurité, à 20° C. Le pH de l'échantillon témoin est ajusté au pH de l'échantillon test. Comme le pH est très acide, deux séries de mesures sont effectuées : l'une à pH réel, l'autre à pH 6,5. Les résultats représentent la moyenne obtenue avec 3 membranes différentes, ils sont exprimés en variation du signal de fluorescence par rapport au signal témoin (Figure 39) ; les écarts-type sont inférieurs ou égaux à 1 %.



à pH non ajusté

Dans les trois cas, le lixiviat de pin abaisse la fluorescence des chlorelles ; la cinétique d'inhibition varie en fonction du type de bois surtout dans les 24 premières heures.



à pH 6.5

Les lixiviats de pin naturel et de pin imprégné diminuent faiblement la fluorescence algale contrairement au lixiviat de pin rétifé ; après 24 heures, l'inhibition est 5 fois plus forte pour ce type de bois.

Fig. 39 : Effet des lixiviats de pin naturel et traités sur le fonctionnement en batch du biocapteur de fluorescence algale, n=3.

♦ Mesures en mode flux :

La fluorescence des chlorelles est suivie pendant trois heures : la membrane algale est soumise à une circulation de lixiviat (pH = 6,5) en flux continu ; les résultats sont exprimés comme précédemment (Figure 40).

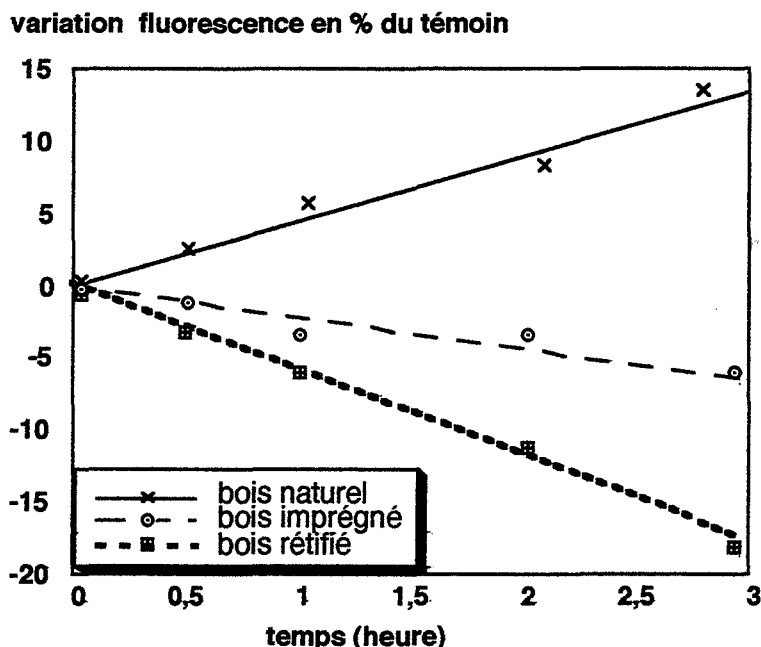


Fig. 40 : Effet des lixiviats de pin naturel et traités (pH 6,5) sur le fonctionnement en flux du biocapteur de fluorescence algale, n=3.

Sur une courte durée, dès le début de l'exposition au lixiviat de pin naturel, la fluorescence est stimulée alors qu'elle est d'emblée diminuée avec les lixiviats de pin traités, de façon spécifique.

III.6.2.2. Les lixiviats de sapin

On procède *en mode batch* comme pour les lixiviats de pin (III.6.2.1, chap.4).

Les résultats sont obtenus avec trois membranes, pour quatre durées d'incubation à pH normal et deux à pH 6,5 (Tableau 28) ; les écarts-type sont ≤ 1 %.

lixiviat de sapin à pH 6,5	bois "naturel"	bois "rétifé"	bois "imprégné"
t = 15 minutes	- 4,7	- 13	- 6,1
t = 5 heures	- 6	- 12	- 13
t = 16 heures	- 4,5	- 6,4	+ 4,6
t = 24 heures	- 6	- 0,05	+ 1

Tab. 28-a : Variation du signal de fluorescence algale exprimée en pourcentage du signal témoin, en présence de lixiviats de sapin.

lixiviat de sapin à pH non ajusté	bois "naturel"	bois "réifié"	bois "imprégné"
t = 15 minutes	- 2,65	- 7,47	- 6
t = 5 heures	- 4	- 8	- 9,8

Tab. 28-b : Variation du signal de fluorescence algale exprimée en pourcentage du signal témoin, en présence de lixiviats de sapin.

On constate que, pour tous les types de bois, l'inhibition est plus marquée à pH 6,5. Pour les lixiviats de sapin naturel et réifié, l'effet est toujours négatif alors qu'il devient stimulant vers 16 heures d'incubation dans le lixiviat de sapin imprégné.

III.6.3. Discussion

Quelle que soit leur origine, *les lixiviats sont toxiques* : la fluorescence des chlorelles est modifiée, le plus souvent dans le sens d'une diminution immédiate ou un peu retardée. Le lixiviat de bois naturel se montre écotoxicologiquement dangereux dans nos conditions expérimentales ; les deux traitements augmentent plus ou moins la toxicité des lixiviats.

L'effet du pH est notable quel que soit le type de bois. Par exemple, pour le pin imprégné, le lixiviat acide entraîne une inhibition du signal de 17 % alors que le lixiviat neutre diminue de 1,5 % le signal émis par le biocapteur après 24 heures d'incubation (Figure 39). Pour le sapin, les résultats sont opposés (Tableau 28). Suivant l'essence, l'effet du pH ne se manifeste pas dans la même façon.

Pour une essence, *le type de traitement effectué a une influence* sur la cinétique de la réponse du biocapteur. Pour le pin et le sapin, l'évolution est opposée.

III.6.4. Bilan relatif au test lixiviat

Le biocapteur s'avère fonctionnel pour des mesures répétées dans des milieux liquides de composition complexe. En mode flux, le biocapteur fonctionne sans altération pendant trois heures, une étude isolée montre que cette durée de vie peut atteindre 24 heures sans perte significative.

Chlorella vulgaris est sensible aux substances présentes dans les lixiviats, même si le bois n'est pas traité ; celles-ci entraînent une perturbation physiologique mesurable par la variation de la fluorescence chlorophyllienne. Le temps d'expérimentation étant relativement court, une éventuelle diminution du nombre de cellules vivantes n'est pas seule en cause.

Les résultats révèlent, au cours du temps, *une différence de comportement du biocapteur en fonction du traitement appliqué au bois et en fonction de l'essence*. Les essais sont à poursuivre pour confirmer que la réponse du biocapteur permet de caractériser le traitement et de donner une première information sur son niveau d'écotoxicité.

Il y a adéquation entre nos résultats et ceux obtenus au Centre Technique du Papier de Grenoble selon la norme ISO T90-304 [Norme européenne, 1993]. Les lixiviats ont été rigoureusement identiques, étant répartis par fractionnement entre les deux laboratoires.

IV. CONCLUSION DE L'ETUDE RELATIVE AU BIOCAPTEUR DE FLUORESCENCE ALGALE

Les résultats précédents appellent les conclusions suivantes.

♦ **L'immobilisation des algues** sur membrane permet la réalisation d'un biocapteur de fluorescence opérationnel. Les mesures montrent la reproductibilité de la méthode d'immobilisation, la possibilité de préparer des lots de membranes utilisables immédiatement ou de façon différée.

♦ **Le biocapteur est fiable**, il donne des signaux reproductibles (<5%) ; il fonctionne en batch et en flux avec une autonomie de 7 jours sans perte notable . Le biocapteur détecte des herbicides anti-PS II ainsi que l'alachlor, l'aminotriazole, le glyphosate et le paraquat ; le biocapteur réagit aux sels de mercure et de cadmium enfin aux lixiviats de bois (milieu complexe acide).

♦ **La comparaison de la fluorescence émise** par les suspensions et les membranes algales montre :

- un signal plus stable et ample en mode immobilisé, ceci s'explique par le fait que la fluorescence s'exprime dans toutes les directions. En suspension, seule l'émission dans l'axe du détecteur est prise en compte alors qu'avec le biocapteur les pertes sont restreintes en raison de la proximité membrane-fibres optiques

- un spectre de détection comparable

- une limite de détection abaissée en mode immobilisé principalement pour les herbicides anti-PS II.

♦ **Les herbicides anti-PS II** - diuron, atrazine, simazine - sont détectés et le biocapteur permet dans la zone de linéarité d'évaluer leur concentration. Les limites de détection sont inférieures aux normes rendant le biocapteur apte à la surveillance en continu du milieu aquatique. Ces produits conduisent à une augmentation du signal, il en est de même pour l'alachlor, l'aminotriazole et le chlorure mercurique.

♦ **D'autres produits** - glyphosate, nitrate de cadmium, paraquat - conduisent à une diminution du signal de fluorescence algale. **Le paraquat**, herbicide dont la cible est le PS I, est étudié ; nos résultats indiquent que cette molécule est particulièrement toxique lorsque l'exposition a lieu partiellement à la lumière.

CHAPITRE 5

**MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGES
APPLIQUEES À LA DETECTION DE TOXIQUES**

CHAPITRE 5

MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGES APPLIQUEES A LA DETECTION DE TOXIQUES

Si la microscopie est le point fédérateur de cette étude, deux options méthodologiques très différentes sont choisies :

I- ETUDE DE *CHLORELLA VULGARIS* EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

Il s'agit d'un test de toxicité aiguë permettant de caractériser l'effet du toxique par l'observation des chlorelles en microscopie électronique à balayage.

II- COMPTAGE ET ANALYSE MORPHOMÉTRIQUE DE *CHLORELLA VULGARIS* PAR MICROSCOPIE OPTIQUE COUPLÉE À L'ANALYSE D'IMAGES

Les chlorelles sont cultivées en présence d'un toxique. Le suivi du nombre et de la morphométrie des cellules lors de la croissance est réalisé par une étude couplée - microscopie optique et analyse d'images -.

L'investigation reste limitée en raison du temps d'analyse long, de la disponibilité limitée des équipements et de la priorité donnée à l'étude concernant les biocapteurs.

Par rapport à la littérature, ces deux études sont originales ; elles constituent des essais préalables de faisabilité.

I. ETUDE DE *CHLORELLA VULGARIS* EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Il s'agit de détecter la présence du toxique dans le milieu grâce à l'observation en microscopie électronique à balayage des cellules. Son impact sur l'aspect cellulaire sera analysé à la recherche du mécanisme d'action.

I.1. Critères de réalisation de l'étude

L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) permet de visualiser dans un dégradé de gris les caractéristiques de surface des cellules ainsi que leur taille. La mise en œuvre de la technique est simple et de courte durée. Les préparations cellulaires peuvent être gardées sans détérioration dans le temps ce qui permet de constituer, pour différentes concentrations du produit, une gamme de référence. Enfin, il est intéressant de pouvoir photographier les cellules altérées et de travailler sur des documents pratiques à consulter.

Les produits sont choisis en fonction de leur action, suggérant soit un retentissement morphologique, soit un effet structural (II.3, chap.1) ; ainsi avons-nous testé :

- le méthanol, pour son action sur la variation de la pression osmotique et son pouvoir de dissolution des molécules lipophiles
- le paraquat et le perchloroéthylène pour leurs actions sur les membranes
- le mercure responsable de diverses actions structurales et métaboliques.

La sensibilité de la souche de *Chlorella vulgaris* vis-à-vis des produits testés a été démontrée par d'autres moyens de détection (chap.3 et 4) ; dans le cadre limité de notre étude, une seule concentration efficace est utilisée pour chaque produit.

Produit testé	Concentration dans le milieu
Mercure	0,1 mM
Méthanol	0,1 M
Perchloroéthylène	0,1 mM
Paraquat	0,5 mM

Tab. 29 : Concentrations des produits étudiés en MEB.

I.2. Méthode et matériel

I.2.1. Protocole de l'étude en microscopie électronique à balayage

Le protocole comporte trois étapes : incubation en présence du toxique, immobilisation des chlorelles, traitement de la membrane algale.

♦ *Incubation en présence du toxique*

Une partie aliquote prélevée dans la culture en phase exponentielle de croissance est mise en contact avec le toxique pendant six heures ; par ailleurs, la suspension algale ($DO_{760} = 0,35$) reste dans les conditions de vie habituelles : agitation, lumière et température (II.2, chap.2).

♦ *Immobilisation des chlorelles*

La membrane servant à l'immobilisation doit être favorable à l'observation microscopique. Parmi les membranes disponibles, trois membranes Whatman® de porosité 0,2 μm et de diamètre 47 mm sont testées :

- membrane Anodisc,
- membrane Cyclopore,
- membrane WCN nitrate cellulose.

La membrane Anodisc est choisie sur les critères nature et structure. De nature inorganique, en alumine de haute pureté, à très faible taux d'extractibles, la membrane est résistante, inerte vis-à-vis des produits utilisés et peu contaminante pour les algues. La structure régulière, avec des pores de 0,2 μm , permet une bonne rétention des cellules en surface et assure un faible bruit de fond lors de l'observation.

La membrane Cyclopore a des capacités de rétention inférieures.

La membrane en nitrate de cellulose est moins résistante au traitement chimique ultérieur.

♦ *Traitement de la membrane algale*

Les algues sont déposées sur la membrane Anodisc par filtration de 10 ml de suspension. Le protocole appliqué est décrit en annexe (**Annexe 8**). La préparation du matériel biologique en vue de l'observation microscopique est conforme au protocole habituel de la microscopie électronique à balayage. Les fixateurs, glutaraldéhyde et tétraoxyde d'osmium sont utilisés à 1% v/v [Marchand, 1974]. La déshydratation à l'éthanol est préférée ; en effet, pour le matériel végétal, l'acétone est davantage destructeur (source d'artefacts) par ses propriétés de dissolution des lipides membranaires [Falk, 1980].

I.2.2. Observation microscopique

L'observation est réalisée au laboratoire de Microscopie Electronique de l'ENSM-SE avec le modèle JEOL® MEB JSM 840.

En parallèle, pour chaque essai, on effectue une observation microscopique sur un microscope Olympus® modèle bh-2 (x 600) ainsi que la mesure de la densité optique de la suspension algale (de 350 à 760 nm) car nous avons noté une variation de couleur de la suspension soumise au perchloroéthylène.

1.3. Résultats

Une membrane témoin est préparée simultanément et dans les mêmes conditions (fixation, déshydratation, séchage) que la membrane test (Figure 41).

On observe, **en présence de méthanol**, des cellules *semblables* aux cellules de la membrane témoin pour l'aspect, la forme et la taille (Figure 42).

Après incubation dans la solution de **sel mercurique**, les cellules présentent un *aspect ponctué*, forme et taille sont habituelles (Figure 43).

En présence de perchloroéthylène, les cellules prennent un *aspect flétri*, leur forme est irrégulière et la taille est plus difficile à estimer (Figures 44).

En présence de paraquat, les cellules prennent un aspect singulier, leur contour est plus irrégulier que celui des cellules témoins et elles présentent une ou deux *dépressions marquées* (Figures 45).

1.4. Discussion

1.4.1. Validation du protocole

Il est notoire que la préparation du matériel en vue de l'observation au MEB entraîne inévitablement des artefacts relevant principalement des étapes de déshydratation et de séchage.

Pourtant, *Chlorella vulgaris* supporte sans distorsion importante le protocole ; le séchage spontané à l'air semble acceptable dans la mesure où les cellules des membranes témoins gardent une surface lisse à faiblement plissée, une forme "naturelle", une taille comprise entre 2,5 et 3,5 μm . La reproductibilité de l'aspect cellulaire évaluée sur cinq membranes permet de valider le protocole.

1.4.2. Action de l'ion mercurique

Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé d'informations rapportant les effets structuraux du mercure sur des micro-algues. Par contre, Molegnana (1993) a observé que les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont sensibles aux sels de mercure à pH acide. Le mercure ne semble pas bioaccumulé au niveau de la paroi mais en microscopie électronique à transmission (MET), des déformations notables des contours cellulaires sont observées correspondant à des invaginations de la membrane plasmique. L'effet du mercure se signale aussi en microscopie optique : la cellule présente un aspect gaufré.

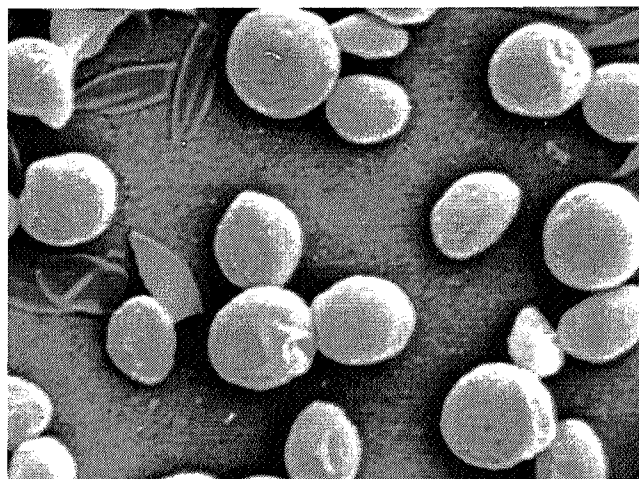


Fig. 41: *Chlorella vulgaris* vues au M.E.B. (x 3000).

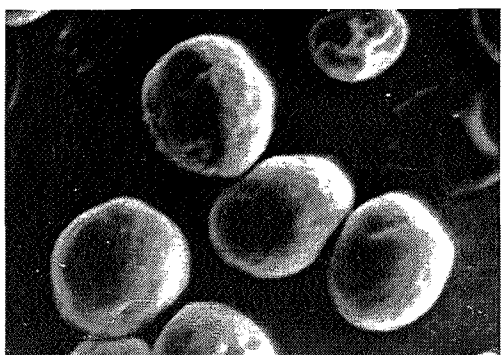


Fig. 42: Effet du méthanol.

(x3500)

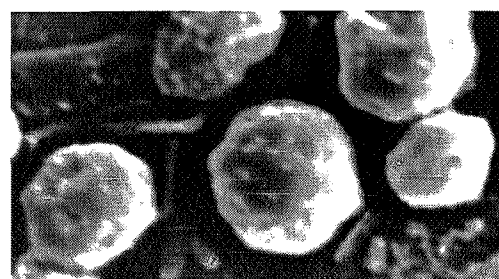


Fig. 43: Effet du mercure.



Fig. 44-a : Effet du perchloroéthylène.

(x3500)

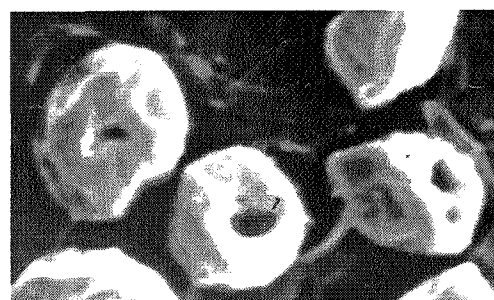


Fig. 45-a : Effet du paraquat.

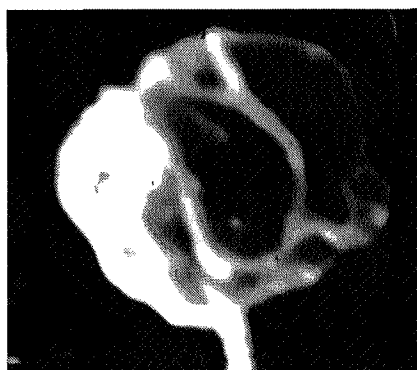


Fig. 44-b : Effet du perchloroéthylène.

(x 20000)

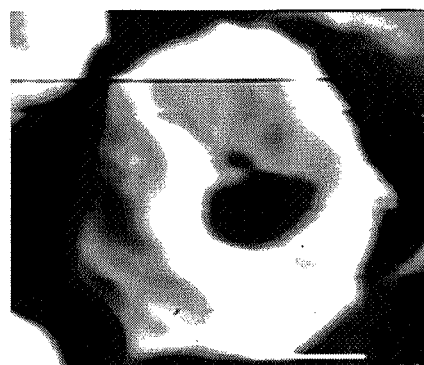


Fig. 45-b : Effet du paraquat.

Pour *Chlorella vulgaris*, nous observons un effet modeste mais reproductible, il concerne seulement l'aspect de la paroi. Il faudrait tester d'autres concentrations et poursuivre les investigations car dans le domaine des métaux, les conditions de l'expérimentation jouent un rôle important. Les effets de ce métal lourd sur la physiologie sont multiples, il est difficile d'émettre une hypothèse sur le mode d'action impliqué ici (II.3, chap.1).

I.4.3. Action du perchloroéthylène

Ce solvant chloré est connu pour son action de solubilisation des lipides membranaires. L'aspect très déshydraté des cellules exposées au perchloroéthylène s'explique par l'action du solvant et non par un protocole de MEB inadéquat ; la comparaison avec le témoin est un 1^{er} argument, d'autre part, nous avons retrouvé ces caractéristiques lors de l'examen au microscope optique. Il semble que cette action concerne l'enveloppe cellulaire car la présence du plaste est incontestable dans les cellules observées en microscopie optique. Le perchloroéthylène, produit peu soluble dans l'eau, agirait davantage au niveau périphérique qu'au niveau interne pour provoquer la désorganisation membranaire. Cependant, nous avons observé un changement de coloration de la suspension algale exposée au solvant. Le spectre d'absorption est peu caractéristique ; il diffère du spectre témoin par (Figure 46):

- le décalage du pic dans le rouge de 685 à 675 nm
- la disparition des autres pics
- un profil qui traduit une densité optique homogène.

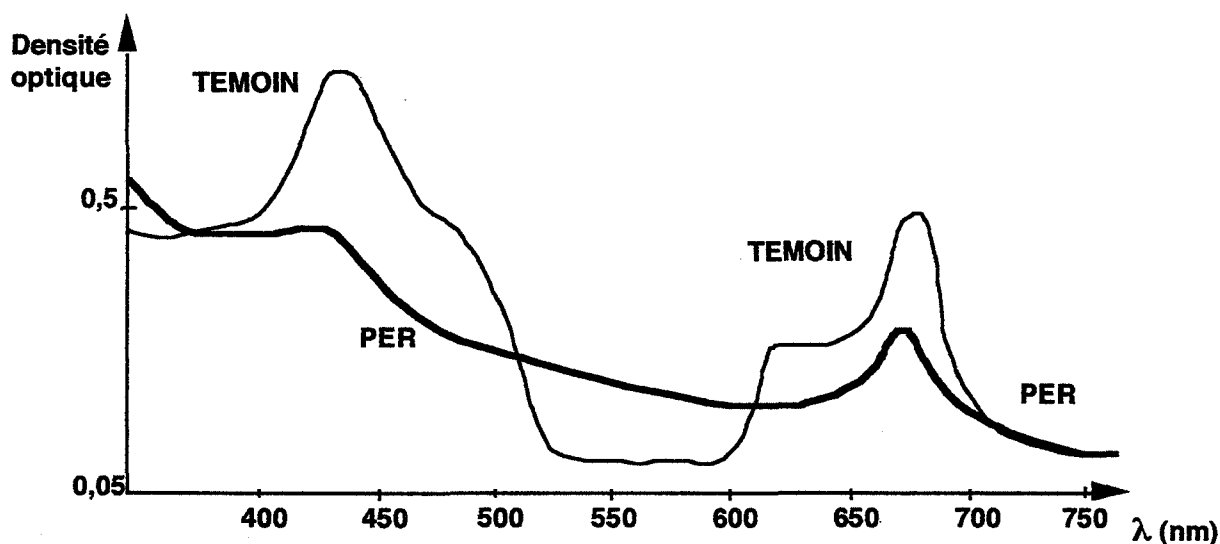


Fig. 46 : Densité optique d'une suspension algale exposée au perchloroéthylène (PER) depuis 6 heures.

En définitive, l'action du perchloroéthylène sur *Chlorella vulgaris* est double :

- dissolution des lipides membranaires périphériques plus forte que celle des lipides membranaires intracellulaires donnant une atteinte morphologique externe avec conservation des structures chloroplastiques.
- altération des pigments par solubilisation.

I.4.4. Action du paraquat

Comme nous l'avons rappelé précédemment (II.3, chap.1), le mode d'action du paraquat est double. En tant qu'herbicide, il perturbe le fonctionnement métabolique redox entre PS II et PS I, en tant qu'agent peroxydant, il provoque des destructions membranaires. Cette dernière conséquence pourrait expliquer l'aspect très particulier des cellules traitées.

Le paraquat, bien que très soluble dans l'eau, pénétrerait assez facilement dans la cellule et agirait principalement au niveau du plaste. Représentant environ 50 % du volume cellulaire, le chloroplaste est constitué de structures membranaires riches en pigments intégrés dans des complexes protéiques et riches en acides gras insaturés. L'acide linoléique particulièrement sensible aux peroxydations représenterait 80 % des lipides des membranes des thylakoïdes [Scalla, 1991]. La destruction de ces structures chloroplastiques rendrait compte de l'aspect "troué" des cellules. L'observation au microscope optique conforte cette hypothèse car la cellule algale conserve sa forme, sa taille, mais son contenu paraît homogène d'un vert moins intense et le chloroplaste n'est plus distinguable. Le spectre d'absorption perd ses caractéristiques : on note l'apparition d'une bande d'absorption plus soutenue de 500 à 600 nm et un affaiblissement de 30 % des pics interprété comme la perte d'efficacité fonctionnelle des pigments par la destruction de leur environnement moléculaire (Figure 47).

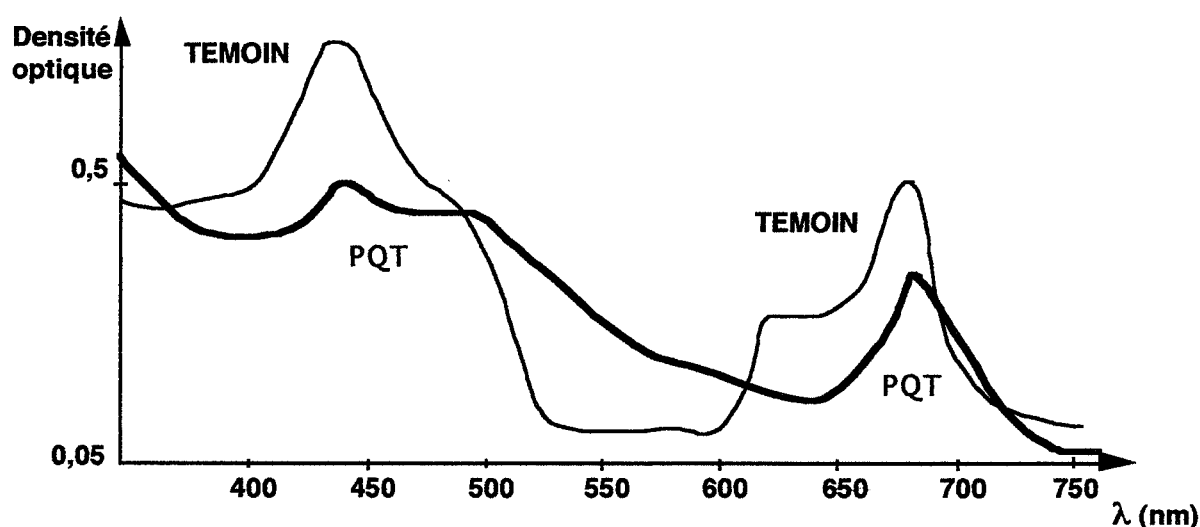


Fig. 47 : Densité optique d'une suspension algale exposée au paraquat (PQT) depuis 6 heures.

I.5. Conclusion relative à l'étude en microscopie électronique

Le perchloroéthylène et le paraquat attaquent tous deux les structures membranaires et les molécules pigmentaires de *Chlorella vulgaris*, mais par des mécanismes différents. L'aspect en microscopie électronique à balayage des cellules altérées pourrait révéler le type d'action et

donc identifier le produit. Le paraquat est particulièrement actif sur les membranes des thylakoïdes et le perchloroéthylène sur l'enveloppe cellulaire.

L'effet du mercure sur *Chlorella vulgaris* est net mais peu évocateur de la perturbation induite. Par contre, la microscopie électronique à balayage n'apporte pas de résultat pertinent dans le cadre restreint de notre étude en ce qui concerne l'effet du méthanol sur cette souche de micro-algues.

II. COMPTAGE ET ANALYSE MORPHOMETRIQUE DE *CHLORELLA VULGARIS* PAR MICROSCOPIE OPTIQUE COUPLEE A L'ANALYSE D'IMAGES

Il s'agit d'effectuer, de façon automatique ou semi-automatique, le dénombrement d'un prélèvement axénique de *Chlorella vulgaris* et de recueillir des informations significatives permettant de détecter une toxicité sur le développement algal.

II.1. Critères de réalisation de l'étude

En biologie, un grand nombre de méthodes d'étude font appel à la vision, souvent par l'intermédiaire de la microscopie, pour détecter la présence d'un caractère ou d'un phénomène et suivre son évolution. Ces méthodes représentent des applications potentielles de l'analyse d'images. Celle-ci peut en effet apporter une plus grande précision et la rapidité lors de la mesure des paramètres recherchés [Vecht-Lifshitz et Ison, 1992]. Les applications de l'analyse d'images dans le domaine des biotechnologies ont été récemment recensées (Tableau 30).

Microbiologie	<ul style="list-style-type: none"> * Quantification de la croissance et viabilité cellulaires. * Estimation de la biomasse. * Mesure de la sensibilité aux antibiotiques. * Adhésion, morphologie et mobilité microbiennes. * Morphologie et métabolisme des micro-organismes filamenteux. * Cultures cellulaires.
Recherche biomédicale	<ul style="list-style-type: none"> * Enzymologie. * Biologie moléculaire et génie génétique. * Histopathologie et neuropathologie.
Matériaux et techniques biologiques	<ul style="list-style-type: none"> * Cultures cellulaires humaines et de mammifères.
Industries alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> * Détection et évaluation de contaminations.

Tab. 30 : Domaine d'applications de l'analyse d'images en biotechnologie [Thomas, 1993].

L'analyse d'images est une méthode puissante, qui présente les avantages de la rapidité, de l'automatisation, dégagée de la subjectivité de l'opérateur mais qui s'avère d'utilisation délicate pour le domaine du vivant. Les réalisations en routine mentionnées dans le tableau ci-dessus résultent d'une coopération pluridisciplinaire : tous les exemples de réussite montrent la nécessité d'une adaptation et d'une grande adéquation du matériel technique et informatique aux exigences du matériel vivant. Les fournisseurs de matériel en font d'ailleurs la proposition.

Peu d'études associent à la fois micro-algues et analyse d'images ; quelques applications dans le domaine de l'environnement ont été identifiées [Roussel, 1994 ; Erbes et al., 1997].

Une équipe de chercheurs de l'ENSM-SE travaillant dans le domaine de la granulométrie des poudres utilise l'analyse d'images. Le matériel et les compétences étant mis à notre disposition, nous avons saisi l'opportunité et mis au point une méthodologie. L'appareillage mis à notre disposition sera utilisé de façon optimisée mais sans modulation.

Dans la norme ISO T90-304, les micro-algues sont cultivées dans des flacons d'Erlenmeyer sous des conditions bien définies en présence de l'effluent à tester ; après 72 et 96 heures, un comptage manuel au microscope permet d'estimer l'impact de l'effluent sur la croissance de l'algue de façon quantitative (% inhibition de la croissance). Pour la culture en présence de toxique, nous suivrons les consignes de la norme. Le dispositif de l'analyse d'images sera employé dès 24 heures pour le comptage des cellules et l'obtention de données morphométriques, avec comme double objectif :

- l'évaluation du caractère toxique du produit vis-à-vis de *Chlorella vulgaris*
- l'accès, si possible, au mécanisme d'action.

Les quatre produits testés appartiennent à des familles chimiques distinctes. Il s'agit du cadmium minéral, d'un chlorophénol, de deux herbicides : l'atrazine et l'aminotriazole. Nous avons montré par ailleurs que ces produits sont toxiques pour *Chlorella vulgaris* (**chap.3 - 4**).

II.2. Matériel et méthodes de l'analyse d'images

II.2.1. Matériel pour l'acquisition et le traitement d'images

L'équipement pour l'acquisition et le traitement d'images est présenté dans la Figure 48.

Le microscope *Olympus modèle bh-2* est équipé d'une platine motorisée d'utilisation facultative et de trois objectifs, le plus puissant (x 50) est retenu en permanence.

La caméra vidéo utilisée pour l'acquisition des images est une caméra à tube, monochrome : *Hamamatsu type C2400-1, tube Chalnicon*. Elle possède, sur son boîtier de contrôle, un réglage du contraste par l'intermédiaire du gain et de l'offset du signal vidéo et un correcteur d'effet d'ombre (shading).

La caméra est équipée d'un objectif *Olympus* de 50 mm et d'un doubleur de focale permettant une prise de vue en position macro. Le grossissement final sur le moniteur de l'analyseur d'image peut varier entre 5 et 26 fois.

L'analyseur d'images est le coprocesseur *Morphopericolor*® de *Matra MS2I* (Le Mesnil St. Denis - France) utilisé pour la numérisation et le traitement d'images. Cet appareil a été conçu par le centre de morphologie mathématique de l'École des Mines de Paris.

Le PC 486DX-33 pilote l'analyseur d'images. Le logiciel de pilotage du *Morphopericolor*® permet l'enchaînement et la répétition d'une série de traitements sous la forme de séquences (ou macro-commande) ; il permet également d'intégrer les fonctions de traitement d'images au sein de programmes écrits en langage PASCAL.

Le *Morphopericolor*® peut traiter deux formats d'images : 256x256 pixels ou 512x512 pixels. Seul ce second format a été utilisé. Dans ce mode, il n'est possible de stocker simultanément que deux images numériques et neuf images binaires (**Annexe 9**). Sur les images numériques, l'intensité des pixels est représentée sur une échelle de 64 niveaux de gris (0 à 63). La représentation d'une image numérique nécessite donc 192 kilo-Octets ($2^6 = 64$).

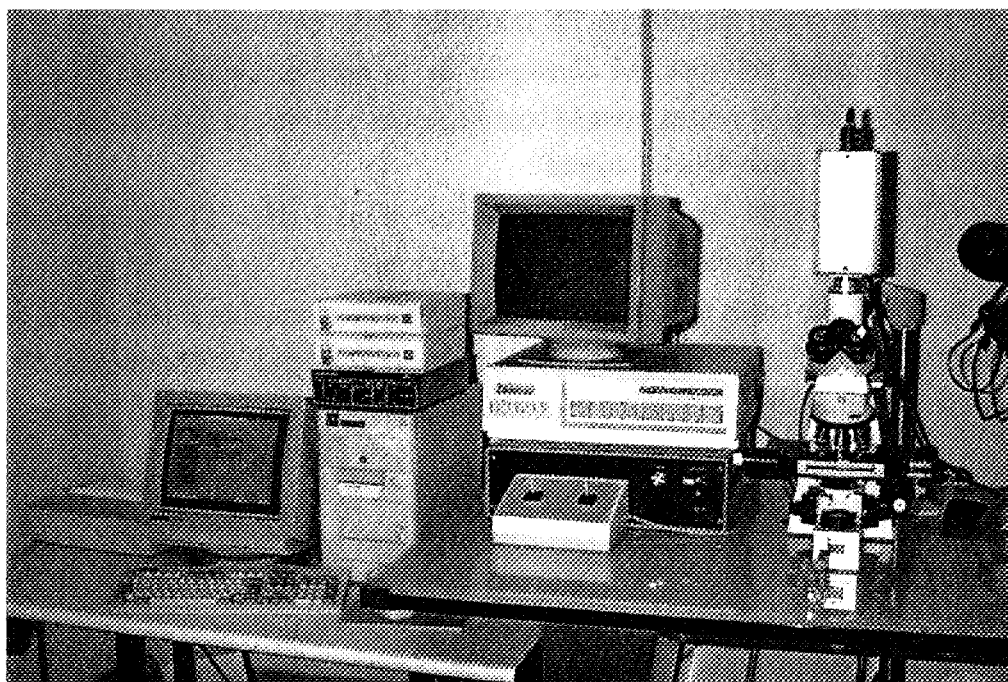


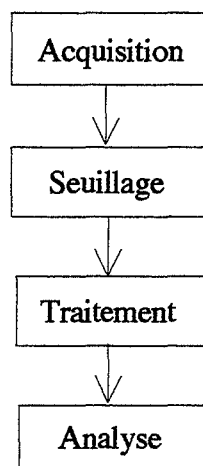
Fig. 48 : Disposition du matériel.

II.2.2. Les étapes de l'analyse d'images sur "*Morphopericolor*"

Il s'agit d'acquérir une image analogique vidéo de l'objet à étudier. Cette image sera numérisée pour être traitée par ordinateur. Par seuillage, l'image numérique est réduite en image binaire dans laquelle la quantité d'informations a été judicieusement sélectionnée. Traiter une image, c'est la transformer en une autre image corrigée des défauts qui entachaient l'image originale. Différentes options sont proposées par l'analyseur. Analyser une image, c'est

mesurer un paramètre significatif. Le logiciel de traitement des images permet l'acquisition des images en continu, ou d'une image isolée.

Ces grandes étapes du traitement d'images sont schématisées par la séquence :



Le principe de ces opérations est décrit en annexe (**Annexe 9**).

II.2.3. Méthode d'étude avec la platine fixe

Lors des premiers essais, nous utilisons le microscope optique avec un grossissement (x 500) et la platine fixe.

Après l'acquisition de l'image vient l'opération de seuillage. C'est une étape-clé ; nous veillerons à obtenir la meilleure mise au point possible. Comme nous travaillons sur un écran noir et blanc, nous choisissons un niveau de gris le plus proche du noir pour sélectionner les micro-algues.

A l'issue du seuillage, on enregistre une image binaire. Puis vient le traitement de cette image binaire. Les différentes options sont sélectionnées : suppression des bords ; l'option bouchage des trous est aussi très employée.

Parfois, et en fonction de la mise au point de l'image, on utilisera les options de segmentation et de fermeture. L'option segmentation permet de séparer des cellules filles qui sont souvent proches en fin de division cellulaire.

Lors de cette séquence, l'opérateur intervient afin de transformer l'image acquise en une image binaire contenant l'information pertinente.

L'image binaire est alors analysée : le logiciel fait le comptage du nombre d'objets pour chaque image, et la mesure du paramètre retenu. On constitue un fichier de données pour chaque image analysée.

Avec la platine fixe, après quelques essais, nous décidons de faire 20 images par préparation afin d'obtenir une moyenne précise du nombre total de micro-algues.

II.2.4. Méthode d'étude avec la platine motorisée

Une platine motorisée est installée sur le microscope. Les options : seuillage ; sélection d'objets ; mesure du paramètre ; comptage ; enregistrement des données sur un fichier sont automatisées. Ceci facilite l'acquisition des images et l'enregistrement des données : 100 images par échantillon sont stockées sur un fichier de résultats.

Le réglage de la platine motorisée est assuré par le logiciel d'analyse d'images. Le protocole opératoire est le suivant : initialisation de la platine au moyen de la commande connexion/déconnexion ; mise au point de l'image ; chargement d'une séquence de commandes enregistrée, celle-ci comporte déplacement, régulation de la vitesse de la platine ainsi que toutes les opérations d'analyse d'images.

La platine motorisée effectue 100 déplacements par échantillon. La surface balayée est ainsi beaucoup plus grande tout en conservant un temps d'acquisition acceptable : une séquence de 100 images dure en moyenne 30 minutes.

II.3. Etude relative au comptage des cellules

II.3.1. Méthodes usuelles

Alors que l'analyse d'images propose le comptage de quelques types cellulaires [Corkidi et al., 1998], les méthodes physiques restent les plus couramment utilisées dans le cas des micro-algues. Très fiables, elles permettent un dénombrement global, sans distinction toutefois entre les cellules capables de se diviser et les cellules mortes. Ce sont des méthodes directes ou indirectes.

♦ *Comptage manuel au microscope*

Le dénombrement s'effectue manuellement, le plus souvent à l'aide de lames de numération, type lame de Thoma ; les contaminants ou les cellules anormales peuvent être éliminés par l'opérateur.

La méthode qui sera prise comme référence pour valider notre dénombrement par analyse d'images est la méthode de Breed, elle ne nécessite pas de lame spécifique. Le protocole est le suivant : une goutte de suspension algale (15 μ L) se répartit sans débordement sous une lamelle de 20 x 20 mm ; le comptage est effectué à un grossissement de 500 sur 10 champs microscopiques. Soit N, le nombre de cellules par mL, on a :

$$N = \bar{n} \cdot \frac{S}{s} \cdot \frac{1000}{15}$$

\bar{n} : nombre moyen des cellules comptées
 S : surface totale de la lamelle
 s : surface d'un champ microscopique

♦ *Comptage avec appareils électroniques*

Le compteur Coulter (Coulter Electronics Inc.) dénombre les cellules de la suspension à leur passage entre deux électrodes, ce qui provoque une variation de résistance électrique ou une variation de tension. Simultanément, le compteur indique la taille de la cellule dont la forme est approximée à une sphère. L'appareil fonctionne en autonomie et de façon rapide.

Le cytomètre de flux fournit à vitesse très élevée, en plus du dénombrement, des indications de taille, de forme, des caractéristiques intracellulaires ; il est cependant préférable de l'utiliser avec des cellules de grande taille. Les cellules injectées dans le capillaire du cytomètre passent au travers d'un faisceau laser qui va exciter tous les fluorochromes présents et réagir avec la surface et les structures cellulaires internes. Différents paramètres optiques comme la fluorescence des cellules et la dispersion de la lumière sont mesurés pendant le temps très court de passage des cellules devant le laser.

♦ *Méthodes spectrophotométriques*

Ces méthodes indirectes sont basées sur l'atténuation de l'intensité lumineuse après passage dans la suspension cellulaire ; la turbidimétrie utilise l'intensité de la lumière transmise, la néphélométrie utilise celle de la lumière diffusée. Cette deuxième méthode est beaucoup moins répandue. La turbidimétrie a déjà été présentée (II.4.3, chap.2).

Aujourd'hui, dans un objectif de dénombrement, les méthodes microscopiques et le recours au compteur Coulter prédominent. Le comptage au microscope par un opérateur expérimenté donne de bons résultats, les artefacts étant éliminés ; la norme ISO T90-304 (**Norme européenne, 1993**) utilise cette méthode. En revanche, l'appareil automatique est moins discriminant, mais il est rapide et a l'avantage d'estimer la taille des cellules.

II.3.2. Résultats

Nous avons mis au point une méthode de comptage des cellules par analyse d'images. Elle sera systématiquement vérifiée par un dénombrement manuel réalisé au microscope, selon la méthode de Breed (II.3.1, chap.5).

II.3.2.1. Validation de la méthode de Breed

Dans un premier temps, nous vérifions la fiabilité de cette méthode appliquée à *Chlorella vulgaris*. Pour trois suspensions algales diluées progressivement, les deux méthodes microscopiques de comptage (Thoma et Breed) sont appliquées. La Figure 49 montre les moyennes obtenues en fonction de la densité optique des suspensions algales.

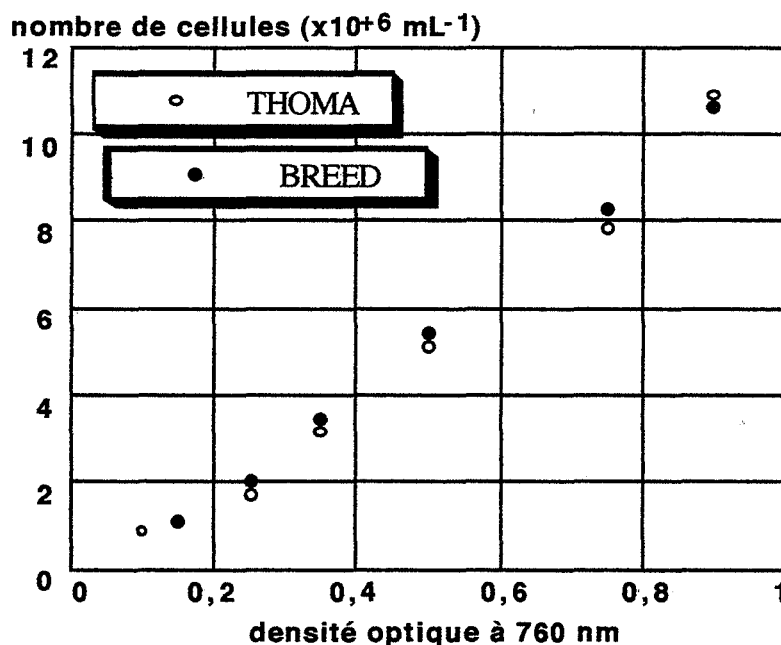


Fig. 49 : Corrélation entre le comptage avec la lame de Thoma et par la méthode de Breed.

Le comptage de *Chlorella vulgaris* présente un inconvénient inhérent à leur mode de reproduction quelle que soit la méthode microscopique retenue. Après croissance, la cellule entre en division. Le stade 2 n'est pas systématiquement discernable et les autospores ne sont pas libérées ; le comptage des chlorelles sous microscope est ainsi sous-estimé. Les tétrades se repèrent à leur grande taille, les 4 autospores sont bien visibles sous la paroi commune. Nous adoptons la convention suivante : le stade 4 terminal sera compté pour 4 cellules, considérant que la séparation des autospores est imminente.

Aux fortes densités ($DO > 0,5$), nous observons des paquets de cellules accumulées aux coins de la lamelle, ainsi suivant la méthode de Breed, le dénombrement peut aussi être exagéré. Les suspensions sont donc diluées à très diluées (densité optique de 0,35 à 0,09).

Les résultats permettent de valider la méthode de Breed : elle montre une bonne corrélation avec le dénombrement par la lame de Thoma. Cette méthode nous semble moins fastidieuse, elle sera utilisée chaque fois que le recours au dénombrement est répétitif.

La reproductibilité du dénombrement par la méthode de Breed a été établie par des comptages effectués par d'autres opérateurs ($CV \leq 15\%$). La relation linéaire établie entre densité optique et nombre de cellules s'applique sans restriction.

Plusieurs échantillons doivent être évalués simultanément. La durée des mesures étant longue, nous avons envisagé la possibilité de différer les comptages manuels. Le comptage peut être reporté sans inconvénient si l'on maintient les suspensions à l'abri de la lumière et à 4° C. Le froid et l'obscurité ralentissent sans dommage le métabolisme et arrêtent la croissance.

Nous avons procédé à des essais sur des cultures témoins et des cultures exposées à l'atrazine ; des parties aliquotes sont prélevées successivement, stockées au réfrigérateur

à 4° C. Les comptages sont effectués toutes les 24 heures de 0 à 96 heures. Les coefficients de variation sont du même ordre que ceux relevés sur les lectures directes.

II.3.2.2. Protocole de la méthode de comptage par analyse d'images

Le protocole suivant est élaboré. Une goutte de 15 μ L, représentative de l'échantillon, est prélevée dans la suspension soumise à une forte agitation. Lame et lamelle sont soigneusement nettoyées et préservées de la poussière ; la réalisation de la préparation microscopique est habituelle. La lamelle carrée (20 x 20 mm) est scellée par de la vaseline pour préserver l'intégrité de la préparation, la dessiccation de la préparation se produisant inévitablement en raison du temps d'observation.

Le dénombrement s'effectue comme indiqué dans la méthode de Breed sur x champs microscopiques (**II.3.1, chap.5**).

En mode manuel, l'opérateur intervient pour les différentes étapes de réglage : mise au point, éclairage, puis pour les opérations de sélection des objets. L'intérêt est de limiter les artefacts et d'appliquer la convention : 1 tétrade compte pour 4 cellules. La durée du travail limite le nombre de champs explorés. Nous choisissons $x = 20$, le repérage des champs étant laissé à l'appréciation de l'opérateur.

En mode automatique, la platine motorisée du microscope effectue les déplacements programmés, soit 20 translations répétées sur 5 transversales, de telle sorte que les 100 champs explorés couvrent toute la lamelle. A chaque déplacement de la platine, une image est acquise, traitée conformément à la procédure utilisée en traitement manuel. La durée des mesures sur une image est réduite, mais les intérêts du mode manuel sont perdus ici : il n'est pas possible de redéfinir de nouveaux paramètres de traitement de l'image à chaque prise de vue, aussi la préparation doit-elle être bien homogène.

II.3.2.3. Comptage par analyse d'images sur des suspensions témoins

Un prélèvement de 100 ml est effectué dans une culture en phase de croissance exponentielle et transféré dans un flacon d'Erlenmeyer de 250 ml. L'expérimentation a lieu sous lumière continue, à 22° C et sur table d'agitation (100 tours par minute).

Le dénombrement des cellules est effectué soit en mode manuel, soit en mode automatique et contrôlé par la méthode microscopique de Breed.

La Figure 50 présente les résultats obtenus par les trois modes de comptage pour trois suspensions témoins ayant subi des dilutions successives.

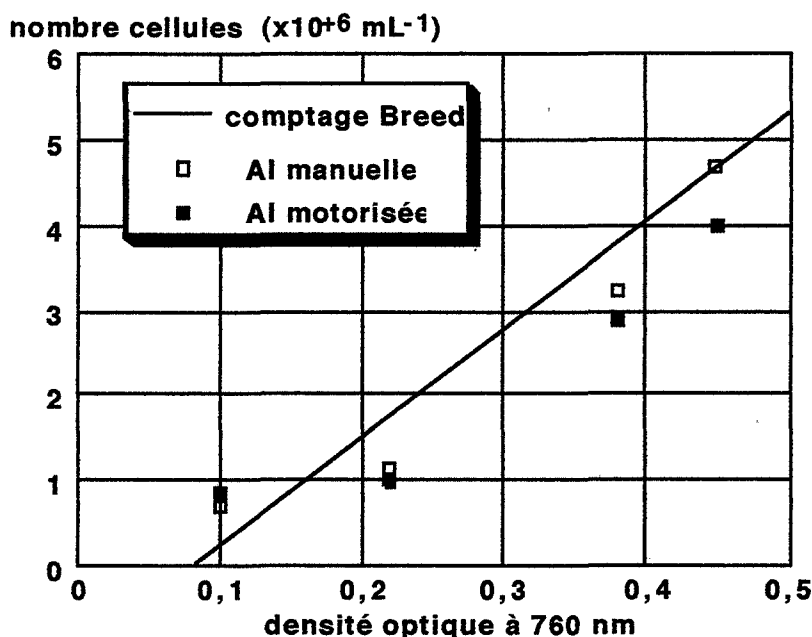


Fig. 50 : Corrélation entre le comptage par la méthode de Breed ($R=0,99$) et le dénombrement par analyse d'images (AI), mode manuel et mode automatique sur des suspensions algales témoins.

Dans l'ensemble des résultats, le dénombrement effectué par analyse d'images est inférieur au dénombrement de référence.

En mode manuel, la reproductibilité de l'évaluation est acceptable, CV maximum de 15 %, pour $n = 3$ échantillons.

En revanche, en mode automatique, les résultats sont irréguliers en raison de la qualité des images binaires. 40 % des résultats sont rejetés car différant de plus de 25 % du dénombrement de référence. La procédure est rapide, les 100 images étant traitées en 30 minutes, aussi peut-on soit réitérer l'opération, soit repérer les anomalies sur les images mémorisées et reprendre leur traitement.

II.3.2.4. Comptage par analyse d'images sur des suspensions tests

Après l'étude des suspensions témoins, nous réalisons des essais sur des suspensions algales exposées à des toxiques. Le mode opératoire est identique au précédent, le produit est ajouté au moment du repiquage. Une seule concentration efficace est choisie pour chacun des produits d'après les résultats obtenus avec les biocapteurs (**chap. 3 et 4**) .

Produit testé	Concentration dans le milieu
Atrazine	1 μ M
Aminotriazole	0,1 mM
Nitrate de Cadmium	1,6 mM
2-Chlorophénol	25 mM

Tab. 31 : Concentrations des produits étudiés en analyse d'images.

La Figure 51 récapitule les résultats obtenus par dénombrement en mode manuel.

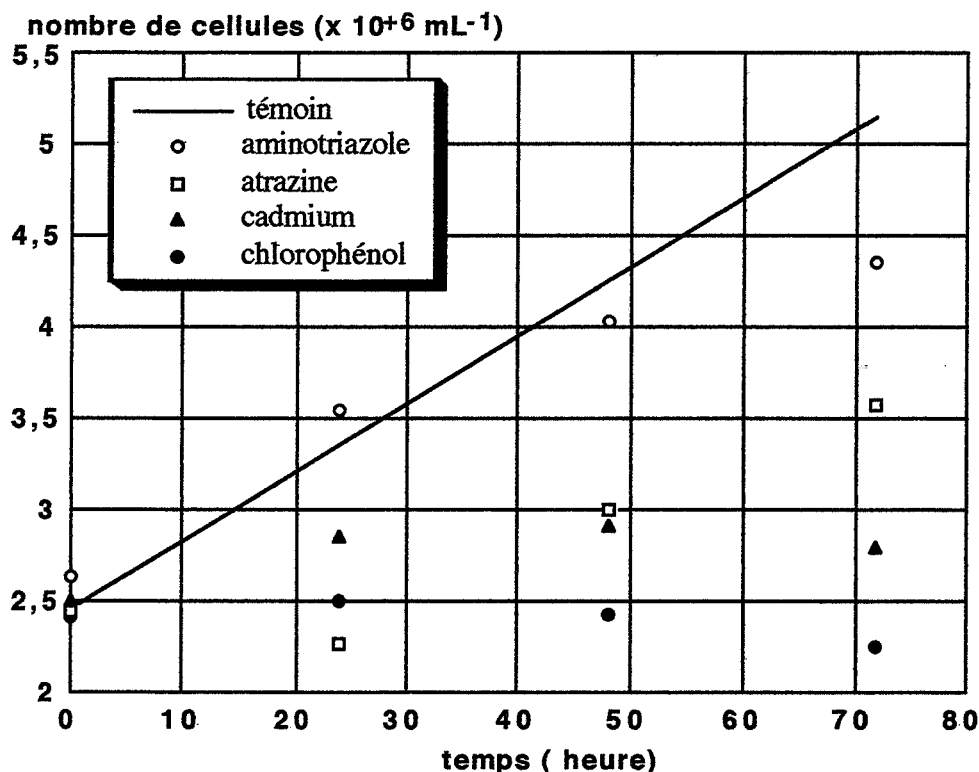


Fig. 51 : Evolution au cours du temps du nombre de cellules des suspensions algales exposées à un toxique, par analyse d'images mode manuel, n=3.

Le 2-chlorophénol a une action brutale et irréversible ; dès 24 h, les *multiplications cellulaires* sont stoppées.

Le cadmium a aussi une action rapide sur les chlorelles : la *population progresse* pendant les premières 24 heures, elle *stagne puis décroît légèrement*.

Avec les *deux herbicides*, on observe une augmentation de la population algale, inférieure à celle du témoin. Le *ralentissement se manifeste rapidement avec l'atrazine, plus tardivement avec l'aminotriazole*. La population témoin double alors que celle de l'échantillon sous atrazine est multipliée par 1,4 et celle de l'échantillon sous aminotriazole est multipliée par 1,65 en 72 h.

II.4. Etude relative à l'analyse morphométrique

II.4.1. Bibliographie

Trois études portant sur des micro-algues et utilisant l'analyse d'images ont été répertoriées [Vihnalek, 1989 ; Roussel, 1994 ; Erbes et al., 1997].

Vihnalek (1989) utilise des *Chlamydomonas* ; après un repérage manuel des micro-algues, suit une procédure automatique. Elle indique le volume des cellules et leur niveau de gris, indice de la teneur en amidon.

Roussel (1994) teste la méthode de l'analyse d'images dans le but d'identifier les micro-algues ; le travail est présenté comme une étude de faisabilité pouvant déboucher sur la surveillance des plans d'eau. L'étude concerne les cyanoprocaryotes.

Erbes et al. (1997) étudient les dommages causés à l'ADN de cellules de *Chlamydomonas* mises en culture en présence de cadmium.

II.4.2. Paramètres de mesure

Dans l'étape analyse de l'image binaire, plusieurs paramètres sont accessibles (Annexe 9).

Le facteur de forme circulaire a été étudié. Il est peu significatif, quelque soit le milieu, on observe :
- 60 % des cellules ont un facteur compris entre 0,875 et 0,95
- et 80 % des cellules ont un facteur compris entre 0,85 et 0,975.

Les micro-algues peuvent être assimilées à des ellipsoïdes. Etant donné les facteurs de forme circulaire obtenus, les autres variables, aire, périmètre, diamètres de ferret, sont interdépendantes.

Seule l'aire des cellules, exprimé en μm^2 , est prise en compte.

II.4.3. Résultats

Les échantillons pour lesquels il y a cohérence entre le comptage au microscope et le comptage par analyse d'images sont retenus pour cette étude.

Dans l'évaluation des aires, la gamme des valeurs répertoriées va de 4 à 40 μm^2 . On fixe une coupure à 14 μm^2 , valeur représentant l'aire maximale au-delà de laquelle la multiplication cellulaire a débuté.

En mode manuel, un dénombrement et une distribution par aire sont réalisés à 24 h et 72 h de culture. A 72 h, le nombre des cellules a augmenté alors que la distribution par aire est restée la même : il y a de 78 à 83,8 % de cellules de petite taille (aire $\leq 14 \mu\text{m}^2$) avec une moyenne de 81,4 % et un écart-type de 2,44 pour n égal à 3. Ce qui représente moins de 5 % de décalage sur le pourcentage moyen entre 24 et 72 heures.

Les résultats sont confirmés en méthode automatisée, par des comptages effectués à 0 et 48 heures.

La Figure 52 montre l'évolution cyclique du pourcentage de petites cellules de *Chlorella vulgaris* ; le cycle montre une période de 48 heures.

"petites cellules" désignent les algues dont l'aire est inférieure ou égale à 14 μm^2

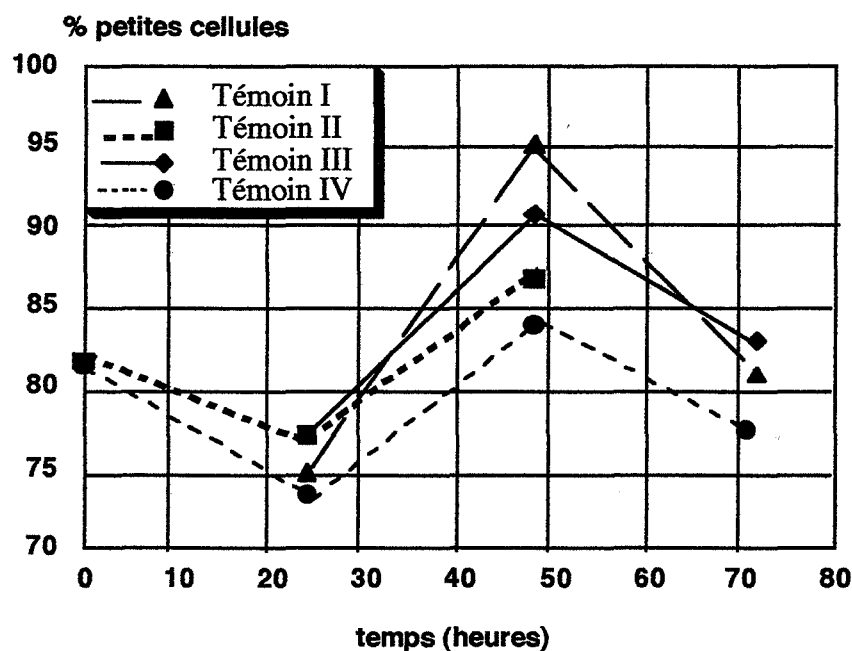


Fig. 52 : Evolution au cours du temps du pourcentage de petites cellules dans des suspensions témoins.

Pour les suspensions tests, exposées aux toxiques, le dénombrement est fait en mode manuel, à 24 et 72 h (Figure 53).

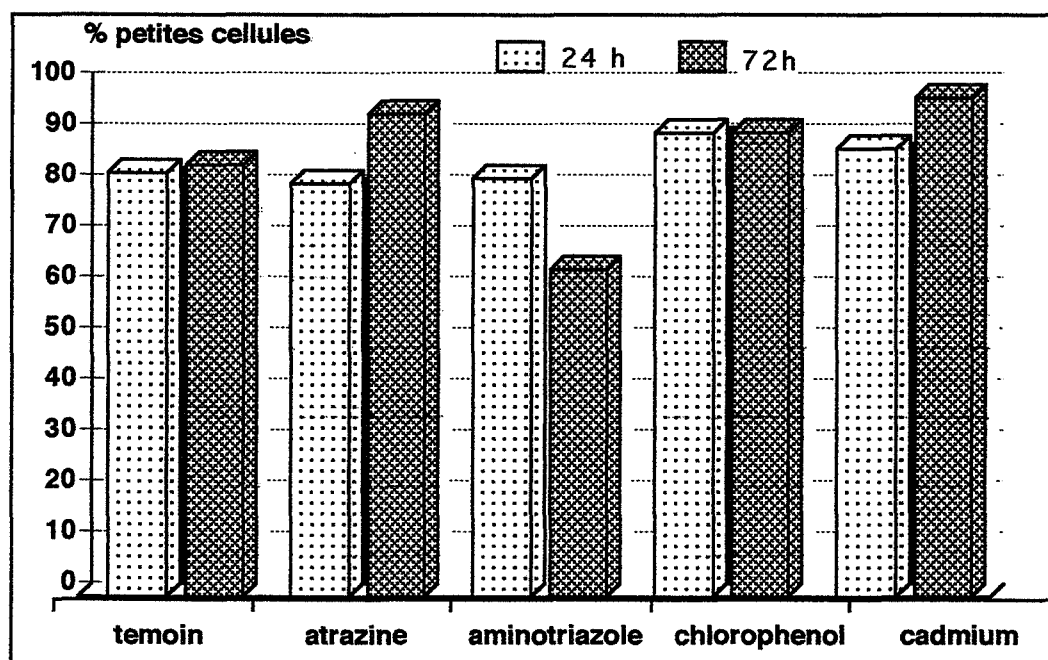


Fig. 53 : Pourcentage de petites cellules évalué à 24 et 72 heures d'exposition à un toxique, en mode manuel.

La tendance oscillatoire du pourcentage de petites cellules, caractéristique des suspensions témoins, semble disparaître pour les suspensions exposées aux toxiques.

En présence d'*atrazine* et de *cadmium*, le *pourcentage de petites cellules augmente* au cours du temps alors qu'il *tend à diminuer avec l'aminotriazole* et *reste invariant sous chlorophénol*.

II.4.4. Discussion

◆ *Sur l'adéquation algue-technique*

Chlorella vulgaris présente deux avantages : le premier relève de la morphologie - des cellules régulières à paroi lisse - ce qui limite les phénomènes d'agglutination, le deuxième tient à l'absence d'organe propulseur.

Par contre, les algues sont de petite taille et présentent peu de contraste vis-à-vis du fond. Des essais de coloration (lugol-bleu de toluidine-cristal violet-safranine) n'ont apporté aucune amélioration. De plus, le mode de reproduction de *Chlorella vulgaris* et le fait que la segmentation ne permet pas facilement de séparer les cellules filles diminuent la précision des résultats.

◆ *Sur le matériel et la technique*

Le microscope optique a un pouvoir séparateur qui permet l'observation des tétrades, voire du stade 2. La prise de vue microscopique effectuée par la caméra donne une image analogique de moindre qualité ; la numérisation introduit des biais par rapport à l'image analogique. Les tétrades les plus petites sont difficilement détectées et le faible contraste entre les algues et le fond ne facilite pas les opérations de traitement de l'image.

Ainsi, le dénombrement par le logiciel est sous-évalué. Il peut être corrigé *a posteriori* grâce aux informations concernant la taille. Sur l'ensemble des échantillons observés, les aires cellulaires s'échelonnent de 4 à 40 μm^2 et, par observation microscopique, nous évaluons un début de stade 2 à 14 μm^2 et le stade 4 terminal est compris entre 30 et 40 μm^2 .

L'option bouchage des trous est très utilisée. Les cellules en division présentent à l'écran des "trous" dus à une différence de contraste entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette correction est utile pour mieux approximer l'aire.

◆ *Au sujet des résultats*

La prise en compte des deux paramètres - évaluation du nombre de cellules et pourcentage de petites cellules - permet de dégager les effets supposés des produits sur le métabolisme de *Chlorella vulgaris*.

Sous 2-chlorophénol, le pourcentage de petites cellules est le même à 24 et 72 heures, comme chez le témoin. Cependant, le comptage ne montre pas d'évolution significative et l'aspect des chlorelles en microscopie optique est bien particulier : noyau apparent, absence de chloroplaste, cellules plus jaunes que vertes. Le 2-chlorophénol stoppe les divisions cellulaires et libère les pigments des structures chloroplastiques ; d'autres effets, métaboliques, non

visibles ici, doivent se manifester. A la concentration de l'essai, l'effet du solvant sur les chlorelles est rapide et irréversible, il y a vraisemblablement *mort cellulaire*.

Le *cadmium* a un net effet modérateur sur l'augmentation du nombre de chlorelles au-delà de 24 h. Néanmoins, le pourcentage de petites cellules augmente car les divisions en cours arrivent à leur terme. Le cadmium pourrait agir sur le métabolisme énergétique via une inhibition ATPasique ou par interaction photosynthétique (inhibition de la biosynthèse des pigments ou du transfert d'électrons des photosystèmes). Le cadmium agirait ainsi *négativement sur la roissance des cellules*, ce qui empêcherait ultérieurement l'entrée en division. L'action rapide mise en évidence ici pourrait s'expliquer aussi par les dommages causés à l'ADN des cellules.

Sous l'action de l'*atrazine*, le pourcentage de petites cellules n'évolue pas de façon caractéristique, on peut justifier l'anomalie par l'hypothèse suivante : la phase de croissance des cellules est plus sensible à l'action de l'herbicide par inhibition de la photosynthèse que la phase de division, pendant laquelle les synthèses sont moindres. *La durée de la phase de croissance cellulaire est allongée.*

Sous l'action de l'*aminotriazole*, l'effet modérateur sur la croissance est faible et devient sensible à partir de 72 h ; le pourcentage de petites cellules, en diminution, semblerait indiquer un *blocage assez tardif des divisions*.

II.5. Conclusion relative à l'étude par analyse d'images

Pour le dénombrement d'un prélèvement axénique de *Chlorella vulgaris*, la procédure semi-automatique serait à améliorer par le choix de matériels et logiciels plus performants. La procédure manuelle donne de meilleurs résultats, mais est dissuasive car trop longue et peu compétitive par rapport aux méthodes conventionnelles de comptage.

Comptage et distribution par aire des cellules permettent de détecter une anomalie dans l'évolution de la culture signifiant une toxicité du milieu. Le suivi au cours du temps de ces deux paramètres rend possible l'évaluation de l'impact du produit d'une part sur la croissance, d'autre part sur la division cellulaire. Les produits testés, atrazine, aminotriazole, 2-chlorophénol et nitrate de cadmium, agissent différemment.

Les résultats de cette étude préliminaire montrent que le recours à l'analyse d'images donnent des informations sur le mode d'action du toxique sur le cycle de développement de *Chlorella vulgaris*.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

La dégradation de notre environnement considérée avec gravité nécessite aujourd'hui et dans un avenir proche la généralisation des moyens de surveillance sur le terrain. La mise au point d'outils analytiques fiables, bon marché, sensibles mais non spécifiques est impérative. C'est dans ce contexte que nous avons **priviliégié l'étude des biocapteurs**. Ces travaux conduisent aux conclusions suivantes.

La conception d'un biocapteur commence par *l'immobilisation de biorécepteurs*.

La méthode d'**immobilisation de *Chlorella vulgaris*** que nous avons mise au point est simple, rapide, reproductible, peu onéreuse ; elle fournit des lots de membranes algales délivrant un signal à valeur statistique. Les chlorelles immobilisées restent fonctionnelles en condition *in vivo* pour des applications biotechnologiques variées : utilisation dans des solutions et en phase gazeuse, association à une électrode et à un faisceau de fibres optiques, pour des mesures en batch et en flux. Les membranes algales se conservent de plusieurs jours à plusieurs semaines. Elles restent fonctionnellement fiables pendant une semaine lorsqu'elles sont intégrées dans un biocapteur.

En revanche, **l'immobilisation des thylakoïdes** est longue et délicate à mettre en œuvre pour des résultats intéressants seulement de façon ponctuelle.

Puis vient *le choix du transducteur* qui enregistre la variation physico-chimique délivrée par le biorécepteur.

♦ Dans un premier temps, nous choisissons **l'électrode de Clark**.

En milieu aqueux, l'électrode algale est sensible aux triazines et aux phénylurées, herbicides agissant sur le photosystème II (herbicides anti-PS II). Nous avons montré qu'elle détecte aussi l'aminotriazole, le glyphosate, le méthanol, le perchloroéthylène, le paraquat. Ces cinq molécules s'ajoutent à la liste établie au cours des travaux précédents.

Les limites de détection des herbicides anti-PS II obtenues avec notre biocapteur sont améliorées par rapport à la détection atteinte dans des études précédentes. On perçoit ici la diversité du monde vivant et la subtilité de fonctionnement des cellules :

- suivant le biorécepteur, la sensibilité vis-à-vis d'un toxique est plus ou moins forte. Ainsi, la bactérie du test Microtox, contrairement à *Chlorella vulgaris*, est insensible aux herbicides anti-PS II.

- suivant le mode opératoire, les performances sont plus ou moins intéressantes comme le montre la comparaison de notre biocapteur avec l'électrode algale étudiée par Pandard (1992).

L'électrode algale possède les qualités métrologiques qui permettent de l'envisager comme **biocapteur potentiel** : mesure en flux, autonomie de fonctionnement, reproductibilité acceptable, faible coût, spectre large de détection. Son utilisation peut se

concevoir comme **outil d'alerte** révélant **une toxicité globale** ou comme capteur pour **la surveillance d'un produit ciblé**. Les herbicides anti-PS II, le méthanol et le perchloroéthylène ont été dosés.

L'électrode à thylakoïdes a une durée de vie brève (quelques heures) et manque de reproductibilité. Elle convient pour **des applications ponctuelles, au laboratoire**. Elle discrimine grâce à ses biorécepteurs un toxique spécifiquement actif sur le PS II.

Notre étude confirme que les biocapteurs à cellules entières sont plus robustes que les biocapteurs à éléments sub-cellulaires mais les limites de détection des herbicides anti-PS II sont semblables dans les deux cas. Pour l'atrazine et la simazine, la limite de détection est inférieure à la norme pour l'eau potable.

Pour la première fois, un biocapteur algal est conçu pour des mesures *en conditions atmosphériques*.

L'étude est limitée, cependant elle révèle des points intéressants. La durée de vie hebdomadaire du capteur et le dosage du méthanol ou du perchloroéthylène permettent d'envisager des prolongements avec d'autres produits vapeurs ou aérosols. Le contrôle de l'atmosphère dans l'enceinte de mesure est manuel, un suivi en continu avec pilotage de la régulation devrait améliorer la stabilité des conditions physiques de l'enceinte et prolonger la durée de vie du biocapteur.

D'autre part, il existe des Chlorophycées aériennes susceptibles de remplacer dans ce contexte analytique la souche de *Chlorella* utilisée.

♦ Ensuite, nous utilisons **un fluorimètre à fibres optiques**.

Si les mesures de fluorescence sur des suspensions algales sont répandues, **le dispositif intégrant fibres optiques et membrane algale** capable de délivrer au choix un signal de fluorescence en batch ou en continu est **nouveau**, à notre connaissance. Simple, compact, ce biocapteur possède **des qualités métrologiques performantes** : très bonne reproductibilité, fonctionnement autonome, durée de vie hebdomadaire. Le biocapteur fonctionne en phase aqueuse, les résultats positifs amènent à envisager une extension de l'étude en phase gazeuse.

Comparé au biocapteur ampérométrique, il nous semble plus avantageux : meilleure reproductibilité, plus grande maniabilité, mise en œuvre moins délicate, souplesse d'adaptation au terrain grâce à la présence des fibres optiques, utilisables dans des milieux peu accessibles. De plus, opérant en fluorimétrie, les mesures sont moins dépendantes du pH, de la température, des interférences électriques du milieu et ne nécessitent pas d'étalonnage du transducteur.

La détection des toxiques par *Chlorella vulgaris* est **améliorée** avec ce dispositif. Le spectre comprend des herbicides anti-PS II, mais aussi des herbicides d'un autre type (aminotriazole, paraquat, ...), des solvants, deux métaux lourds (Cd, Hg). Les limites de détection dépendent des conditions opératoires (goutte, immersion, flux), mais de toute façon

elles sont intéressantes vis-à-vis de la réglementation, souvent nettement inférieures à celles obtenues avec des systèmes antérieurs.

Suivant la cible de la molécule toxique, le signal délivré par ce biocapteur varie à la hausse ou à la baisse. Cet aspect peut être vu positivement car d'une part, il permet de discriminer deux groupes de toxiques, et d'autre part, il donne **accès au mécanisme d'action du toxique**. Les herbicides anti-PS II entraînent une stimulation de la fluorescence. Après identification et étalonnage de la molécule, un dosage est envisageable. En présence d'un mélange de toxiques, le biocapteur peut annoncer une anomalie discrète et incertaine dans l'interprétation. En pratique, l'installation de balises *in situ* ayant lieu après enquête déterminant les polluants les plus communs dans la zone, le recours à ce type de biocapteur, dans un lieu bien choisi, est envisageable.

Nous avons par ailleurs cherché **des méthodes originales**, utilisables dans le domaine de l'écotoxicologie analytique. Ces dernières années sont marquées par un regain d'intérêt pour la microscopie avec l'arrivée de nouveaux matériels. Les progrès de la micro-informatique, son adaptation à divers domaines de l'analyse nous ont amené à l'employer pour la détection de toxiques. Notre étude en microscopie présente des aspects positifs qui appellent des compléments d'expérimentation.

♦ En ce qui concerne la MEB, nous avons relevé **des effets significatifs du paraquat et du perchloroéthylène sur les cellules de *Chlorella vulgaris***. Les effets du mercure sont aussi bien visibles. Il semblerait intéressant d'établir une gamme d'étalonnage pour conforter ces premiers résultats. La **méthode est qualitative** : elle permet de discriminer les trois molécules. Le méthanol, pour la concentration testée, n'a pas eu de répercussion observable.

Cette méthode se présente comme **un bioessai de toxicité aiguë permettant la détection de toxique** ainsi que **l'approche du mécanisme d'action sur les structures cellulaires**.

Bien que la MEB nécessite un appareillage onéreux et peu répandu, cette méthodologie présente plusieurs atouts tels que rapidité, simplicité, disponibilité et pertinence des résultats. Avec la commercialisation récente de nouveaux types de microscope électronique à balayage acceptant des *échantillons hydratés*, cette méthodologie semble encore plus prometteuse : la préparation des échantillons et ses contraintes (utilisation de solvants + artefacts de préparation) deviennent caduques, l'effet du toxique pourrait ainsi devenir plus net.

♦ Ces dernières années, **l'analyse d'images** est entrée dans une phase d'expansion. Cette méthodologie appliquée aux micro-organismes et aux cellules humaines est utilisée en routine dans certains secteurs de l'hygiène alimentaire et du diagnostic médical, grâce à une démarche conjointe des biologistes et des informaticiens.

Le bilan de notre étude est mitigé. Appliquée aux algues, **la méthode reste perfectible** avec un matériel mieux adapté, en particulier au niveau informatique car la gestion des fichiers est lourde et consomme beaucoup de temps ; il en est de même au niveau de la mise au point de l'image analogique qui est l'étape décisive.

De nombreux **perfectionnements** restent à obtenir **pour le comptage** ; une gestion semi-automatique pourrait être un compromis valable.

En revanche **pour la partie morphométrie, les résultats sont encourageants**. Alors que la norme ISO T90-304 apporte une information "binaire" (oui-non) sur la croissance, la méthode employée ici donne des indications plus précises grâce au suivi cinétique de la croissance et des divisions cellulaires. Nous avons pu montrer que **le cadmium et le chlorophénol** perturbent rapidement le cycle de développement de *Chlorella vulgaris* alors que l'effet de **l'atrazine** ou de **l'aminotriazole** est plus lent. Grâce à l'automatisation de la méthode, le suivi cinétique pourrait se faire en continu dès 24 heures.

Cette méthode apparaît comme un bioessai permettant **la détection d'une toxicité globale du milieu** ; elle apporte **une première information sur le mode d'action de la molécule** qui affecte le développement de *Chlorella vulgaris*.

Au cours de cette étude, nous avons évalué **l'impact du paraquat et du perchloroéthylène** sur *Chlorella vulgaris*, **par trois méthodes d'analyse**. Ceci nous amène à proposer un complément d'information sur le mécanisme d'action de ces molécules.

♦ Les données toxicologiques indiquent que **le paraquat** est un herbicide perturbant le bon déroulement de la photosynthèse ; son potentiel redox standard lui permet de jouer le rôle d'**accepteur d'électrons dans la chaîne photosynthétique**, très en aval du PS II. Ce produit est aussi toxique par les **peroxydations** qu'il provoque au sein de la matière vivante.

Les résultats quantitatifs obtenus avec nos deux biocapteurs montrent une **inhibition** de la production d'oxygène photosynthétique et une inhibition de la fluorescence chlorophyllienne. Ces effets toxiques irréversibles, qui progressent dans le temps, signifient une atteinte des **réactions précoces de la photosynthèse**. L'étude qualitative réalisée au microscope optique et au MEB objective la perte de volume cellulaire par rétraction centrale, interprétée comme **la désintégration du chloroplaste** devenu invisible au microscope optique.

En résumé, nos résultats permettent d'avancer l'hypothèse d'une désorganisation structurale des membranes thylakoïdiennes qui abaisserait l'efficacité fonctionnelle du PS II. Cette interprétation est cohérente avec l'effet peroxydatif du paraquat, compte tenu de l'importance des interactions moléculaires pour l'expression fonctionnelle du PS II. L'effet au niveau des réactions redox semble moins important, le fait que la lumière intensifie les dégâts renforce cette idée.

♦ Le mécanisme d'action du **perchloroéthylène** est connu avec moins de précision. Très lipophile, il est un **solvant des acides gras**. Ces molécules constituent l'architecture des membranes cellulaires, mais on leur accorde de plus en plus un rôle fonctionnel car stabilisateur des protéines effectrices du métabolisme.

L'impact des solutions diluées de perchloroéthylène sur le métabolisme photosynthétique des chlorelles est **inhibiteur**, rapidement irréversible quand les concentrations augmentent. Le tracé plat du signal de fluorescence signifie une **atteinte structurale du PS II**. Le spectre d'absorption des suspensions de chlorelles exposées pendant plusieurs heures à ce solvant indique un **solubilisation partielle des pigments**. Mais l'observation réalisée en microscopie montre **une atteinte marquée de la paroi cellulaire** alors que l'intégrité du chloroplaste est conservée.

Le perchloroéthylène agirait principalement sur la première barrière lipophile représentée par la paroi de sporopollénine et les lipides de la membrane cellulaire. A l'intérieur, le perchloroéthylène désorganiserait les édifices membranaires par solubilisation des molécules lipophiles.

Les objectifs de l'étude reposent sur **l'innovation et la pluridisciplinarité** appliquées au domaine du contrôle de la qualité de l'environnement. Le travail présenté ici est une étude préalable qui montre que **deux voies**, celle du **biocapteur de fluorescence** et celle de la **microscopie**, sont **prometteuses**. Quant à *Chlorella vulgaris*, déjà bien utilisée dans ce domaine, notre étude confirme qu'elle est un **biorécepteur** tout à la fois **robuste** sur le plan manipulation et **sensible** vis-à-vis des molécules dangereuses pour l'environnement aquatique. L'incorporation de *Chlorella vulgaris* dans un biocapteur fonctionnant en atmosphère gazeuse confirme son importance dans les études écotoxicologiques et ouvre un nouveau champ d'application des biocapteurs à la surveillance des atmosphères. L'exploitation de *Chlorella vulgaris* par diverses méthodes analytiques contribue à l'amplification et à l'amélioration des moyens de détection, de dosage et d'approche du mécanisme d'action des polluants.

CE TRAVAIL FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SUIVANTES

Publications

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1998

Whole-cell biosensor for determination of volatile organic compounds in the form of aerosols.

Analytica Chimica Acta **364** (1-3), p153-158.

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1998

Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours.

Biosensors & Bioelectronics **13** (3-4), p 341-346.

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1994

Biocapteur algal et détection des solvants.

Le recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux.
Proceedings du Colloque européen à Nancy, Octobre 1994, p 141-143.

Communications

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1996

Fluorescence-based biosensor using micro-algae for determination of toxic compounds.

Poster accepté pour présentation à *The fourth World Congresss on Biosensors à Bangkok* du 29 au 31 mai 1996.

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1996

Biocapteur à algues immobilisées pour la détection des solvants en phase aqueuse et phase gazeuse.

Poster présenté au *Salon Pollutec de Lyon* du 22 au 25 octobre 1996 .

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1994

Whole cell-based biosensor for toxicity assessment.

Poster présenté au *Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis de Paris* du 12 au 14 septembre 1994.

NAESSENS M. et TRAN-MINH C. : 1994

Biocapteur algal et détection des solvants.

Poster présenté au *European Symposium on the Biological Resort for Continuous monitoring of Water quality de Nancy* du 13 au 14 octobre 1994.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABOU-WALY H., ABOU-SETTA M. M., NIGG H. N., MALLORY L. L. : 1991

Growth response of freshwater algae, *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **46** ; p 223 - 229.

ABOU-WALY H., SHABANA E. F. : 1993

Recovery of *Nostoc muscorum* previously exposed to some triazine and phenylurea herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **50** ; p 665 - 673.

ACTA : 1992

Index phytosanitaire, 28^e édition. Ed. Association de Coordination Technique Agricole, Paris.

ANTON F. A., ARIZ M., ALIA M. : 1993

Ecotoxic effects of four herbicides (glyphosate, alachlor, chlortoluron and isoproturon) on the algae *Chlorella pyrenoidosa* chick. *The Science of the Total Environment, supplement* ; p 845 - 851.

ARMINES : 1986

Procédé de fabrication d'un matériau lignocellulosique et matériau obtenu par ce procédé. *Brevet Fr. N° 86-14138*.

ARNON D. I. : 1949

Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **4** (1) ; p 1 - 4.

BACQ-CALBERG C. M., COYETTE J., HOET P., NGUYEN-DISTECHE M. : 1995

Les algues dans *Microbiologie*. Prescott-Harley-Klein. Ed. de Boeck Université ; pp 539 - 545.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. et N., LACROIX J.-C. : 1981

Biologie et physiologie cellulaire (III). Chloroplastes, peroxyosomes, divisions cellulaires. Ed. Hermann, Paris ; pp 3 - 87.

BESOMBES J. L. : 1994

Elaboration et caractérisation de biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation d'enzymes dans les gels inorganiques et les matrices polymères. *Thèse de l'Université de Savoie*.

BITTON G., KOOPMAN B. : 1992

Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **125** ; p 1 - 22.

BOZEMAN J., KOOPMAN B., BITTON G. : 1989

Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology*, **14** ; p 345 - 352.

CALLEGARI J. P. : 1989-a

L'exploitation des micro-algues : essor d'une technologie. *Biofutur*, **76** ; p 26 - 32.

CALLEGARI J. P. : 1989-b

L'immobilisation des micro-algues : applications potentielles. *Biofutur*, **76** ; p 33 - 38.

CARPENTIER R., LORANGER C., CHARTRAND J., PURCELL M. : 1991

Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Analytica Chimica Acta*, **249** ; p 55 - 60.

CLARK L. C., LYONS C. : 1962

Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102** ; p 29 - 45.

CLIJSTERS H., VAN ASSCHE F. : 1990

Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment*, **13** ; p 195 - 206.

COCQUEMPOT M. F., THOMASSET B., BARBOTIN J. N., GELLF G., THOMAS D. : 1981

Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11** ; p 193 - 198.

CONRAD R., BUCHEL C., WILHELM C., ARSALANE W., BERKALOFF C., DUVAL J. C. : 1993

Changes in yield of *in vivo* fluorescence of chlorophyll *a* as a tool for selective herbicide monitoring. *Journal of Applied Phycology*, **5** ; p 505 - 516.

CORKIDI G., DIAZ-URIBE R., FOLCH-MALLOL J.L., NIETO-SOTELO J. : 1998

COVASIAM : an image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (4) ; p 1400 - 1404.

COSTER M., CHERMANT J. L. : 1985

Précis d'analyse d'images. Ed. Cnrs, Paris.

DAVIS D.L., BRADLOW L. : 1995

Œstrogènes et cancer du sein. *Pour la Science*, **218** ; p 74 - 80.

DENNISON M. J., HALL J. M., TURNER A. P. F. : 1996

Direct monitoring of formaldehyde vapour and detection of ethanol vapour using dehydrogenase-based biosensor. *Analyst*, **121** ; p 1769 - 1773.

DESCOTES J., TESTUD F., FRANTZ P. : 1992

Les urgences en toxicologie. Ed. Maloine, Paris.

DODGE J. S. : 1973

The cell covering dans *The fine structure of algal cells* . Ed. Academic Press, New-York ; pp 21 - 55.

DUESO N. : 1997

La pollution par les COV : définitions, sources et solutions. *Informations Chimie* , **387** ; p 76 - 79.

EL YAMANI H., TRAN-MINH C., ABDUL M., DUPONT M. : 1987

Réalisation d'un ensemble automatisé pour la mesure de la toxicité des eaux de rivière. *Journal Fr. d'Hydrologie* , **18** (1) ; p 67 - 75.

ERBES M., WEßLER A., OBST U., WILD A. : 1997

Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* , **30** ; p 448 - 458.

ETUDE INTER-AGENCES : 1993

Etude qualitative et quantitative des sources diffuses de solvants chlorés. *L'Actualité Chimique*, juillet/août/septembre ; p 69 - 79.

FALK R. H. : 1980

Preparation of plant tissues for SEM dans *Scanning Electron Microscopy II* ; pp 79 - 87.

FARGASOVA A. : 1993

Effect of five toxic metals on the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia, Bratislava*, **48** (3) ; p 301 - 304.

FOURNIER E. : 1993

Toxicologie : biologie cellulaire appliquée à la sécurité des produits chimiques. Ed. Ellipses, Paris.

GALAL-GORCHEV H., OZOLIN G., BONNEFOY X. : 1993

Révision des valeurs guides de l'OMS pour l'eau destinée à la consommation humaine. *Courants*, **21** ; p 22 - 30.

GAUJOUS D. : 1994

Pollution des milieux aquatiques, aide-mémoire. Ed. Lavoisier, Paris.

GISBY P. E., HALL D. O. : 1980

Biophotolytic H₂ production using alginate-immobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalyst. *Nature*, **287** ; p 251 - 253.

GUENEAU P., ETIENNE A. L. : 1994

Les biocapteurs environnementaux en France. Etude préparatoire à la mise en place de programmes de recherches coordonnées sur le thème des biocapteurs environnementaux. Programme Ecotech-Cnrs, Meudon France.

HAGGETT B.G. D., ROGERSON J. G., RAWSON D. M. : 1995

Redox-mediated monitoring of immobilized *Escherichia coli* exposed to a vapour phase. *Bioelectronics and Bioenergetics* , **37** ; p 77 - 80.

HAGUENOER J. M., FURON D. : 1981

Toxicologie et hygiène industrielles. Les dérivés minéraux-1^o partie. Ed. Lavoisier, Paris ; pp 213 - 231.

HARTWIG A. : 1994

Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity : a review. *Environmental Health Perspectives*, **supplement 3** ; p 45 - 50.

HIPKINS M. F., BAKER N. R. : 1986

Photosynthesis, energy transduction. A practical approach. Ed. Irl Press, Oxford.

HOWARD P. H. : 1990

Handbook of environmental fate and exposure data for organics chemicals. Solvents, vol. II. Ed. Lewis Publishers ; pp 310 - 429.

INERIS : 1995

Pollution atmosphérique : la logique de la prévention. *Références*, **14**. Ed. Ineris, Paris.

INRS : 1984

AMINOTRIAZOLE. Fiche toxicologique n° 200. *Cahiers de notes documentaires* , **115**. Ed. Inrs, Paris ; p 271 -274.

INRS : 1997-a

CADMIUM ET COMPOSES. Fiche toxicologique n°60. *Cahiers de notes documentaires*. Ed. Inrs, Paris.

INRS : 1997-b

MERCURE ET COMPOSES MINERAUX. Fiche toxicologique n°55. *Cahiers de notes documentaires* . Ed. Inrs, Paris.

INRS : 1997-c

METHANOL. Fiche toxicologique n °5. *Cahiers de notes documentaires*. Ed. Inrs, Paris.

INRS : 1983-d

PARAQUAT. Fiche toxicologique n°182. *Cahiers de notes documentaires* , **111**. Ed. Inrs, Paris ; p 289 - 292.

INRS: 1997-d

PHENOL. Fiche toxicologique n°15. *Cahiers de notes documentaires*. Ed. Inrs, Paris.

INRS : 1997-e

TETRACHLOROETHYLENE. Fiche toxicologique n°29. *Cahiers de notes documentaires*. Ed. Inrs, Paris.

INRS : 1997-f

Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction ; Réglementation européenne. Fiche ND 2063-169-97. *Cahiers de notes documentaires*, **169** ; Ed. Inrs, Paris ; p 547 - 573

JACKMAN P. J. H. : 1989

Image analysis in Computers in *Microbiology* : a practical approach. Bryant T. N. and Wimpenny J. W. T. Ed. Press, Oxford.

JACQUES F., FLAMBEAU J. P., ORY J. M. : 1994

Biotoxitel : biocapteur algal pour la surveillance de la qualité de l'eau dans "le recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux", Colloque Européen de Nancy ; p 45 - 50.

JEANNE N., DAZY A. C., MOREAU A. : 1993

Cadmium interactions with ATPase activity in the euryhaline alga *Dunaliella bioculata*. *Hydrobiologia*, **252** ; p 245 - 256.

JORET J. C. : 1991

Détection enzymatique ou immuno-enzymatique des pesticides. *Point Sciences et Techniques*, **2** (3) ; p 17 - 18.

JOURNAL OFFICIEL : 1991

Eaux destinées à la consommation humaine - Normes françaises pour l'eau potable. Extrait du décret n° 89-3 du 3/01/89 modifié par les décrets n° 90-330 du 10/04/90 et n° 91-257 du 07/03/91 et par la circulaire du 16/05/89. JO de la République Française du 7/03/91 ; p 3822 - 3829.

JOURNAL OFFICIEL : 1993

Arrêtédu 1/03/93 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux rejets des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation. JO de la République Française du 28/03/93 ; p 5283 - 5300.

KAI Y. : 1991

Chemistry of extractives in Wood and Cellulosic Chemistry. Ed. Hon and Shiraishi ; pp 215 - 255.

KARUKSTIS K. K. : 1992

Chlorophyll fluorescence analyses of photosystem II reaction center heterogeneity. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **15** ; p 63 - 74.

KONG Z., VANROLLEGHEM P. A., VERSTRAETE W. : 1993

An activated sludge-based biosensor for rapid IC₅₀ estimation and on-line toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, **8** ; p 49 - 58.

KRAUSE G. H., WEISS E. : 1991

Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42** ; p 313 - 349.

KUMARAN S., TRAN MINH C. : 1992-a

Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques. *Electroanalysis*, **4** ; p 949 - 954.

KUMARAN S., TRAN MINH C. : 1992-b

Determination of organophosphorous and carbamate insecticides by flow injection analysis. *Analytical Biochemistry*, **200** ; p 187 - 194.

KWAN K. K. : 1989

Testing of coloured samples for toxicity by the algal-ATP bioassay microplate technique. *Environmental Pollution*, **60** ; p 47 - 53.

LEMIEUX S., CARPENTIER R. : 1988

Properties of immobilized thylakoid membranes in a photosynthetic photoelectrochemical cell. *Photochemistry and Photobiology*, **48** (1) ; p 115 - 121.

LIVINGSTONE D. R. : 1993

Biotechnology and Pollution Monitoring : Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **57** ; p 195 - 211.

LU F. C. : 1992

Toxicologie. Ed. Masson, Paris.

MANTRIPRAGADA S. S. H., FACKRELL H. B. : 1990

Image analysis of biological systems with microcomputers. *Int. J. Biomed. Comput.*, **26** ; p 271 - 281.

MARCHAND H. J. : 1974

Scanning electron microscopy of algal cells dans *Scanning Electron Microscopy*, ITT Research. Institute, Chicago, IL 60616 ; pp 352 - 358.

MAZZEI F., BOTRÈ F., LORENTI G., SIMONETTI G., PORCELLI F., SCIBONA G., BOTRE C. : 1995

Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Analytica Chimica Acta*, **316** ; p 79 - 82.

MERLIN G., MERLE V., BLAKE G. : 1994

Mesure de la cinétique d'induction de fluorescence chlorophyllienne d'algues vertes unicellulaires comme biotest algal. *Actes du Congrès Aghtm de Nîmes* ; p 267 - 281.

MIMEAULT M., CARPENTIER R. : 1989

Kinetics of photocurrent induction by a thylakoïd containing electrochemical cell. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **22** ; p 145 - 158.

MOLEGNANA J. : 1993

Etude de l'influence des métaux lourds sur l'activité fermentaire de *Saccharomyces*, application à la détection de ces éléments en milieux aqueux complexes. *Thèse de l'Université Cl. Bernard - Lyon I*.

NIELSEN S. A., HOUGAARD T. : 1993

An alternative test using algal cultures for testing chemicals for toxicity. *Atla*, **21** ; p 196 - 201.

NORME EUROPEENNE : 1993

Indice de classement ISO T90-304. Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*. NF EN 28 692, ISO 8692.

OKAY O. S., MORKOC E. : 1994

Effects of two herbicidal wastewaters on *Chlorella sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Pollution*, **84** ; p 1 - 6.

PADDLE B. M. : 1996

Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*, **11** (11) ; p 1079 - 1113.

PANDARD P., VASSEUR P. : 1992

Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux : application des bioélectrodes algales. *Revue des sciences de l'eau*, **5** (3) ; p 445 - 461.

PANDARD P., VASSEUR P., RAWSON D. M. : 1993

Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic system. *Water Research*, **27** (3) ; p. 427 - 431.

PANDARD P. : 1992

Etude de biocapteurs à algues immobilisées pour le contrôle des milieux hydriques. *Thèse de l'Université de Metz*.

PAYOT N.G. : 1995

Composition cosmétique ou pharmaceutique anti-radicaux libres pour application topique. Laboratoires PAYOT, brevet FR 629397.

PICOT A., ZERBIB J.C., CASTEGNARO M. : 1993

Sécurité et prévention, risques liés à la manipulation des produits cancérogènes. *L'Actualité Chimique*, juillet/août/septembre ; p 44 - 49.

PURCELL M., CARPENTIER R., BELANGER D., FORTIER G. : 1990

Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnology Techniques*, 4 (5) ; p 363 - 368.

RAWSON D. M., WILLMER A. J., TURNER P. F. : 1989

Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors*, 4 ; p 299 - 311.

RICO A.G. : 1995

Produits phytosanitaires : évaluation des risques et problèmes du futur. *Toxicologie et Pollution de l'air : Evaluation du risque*. Actes du Congrès de Dijon ; p 23 - 27.

ROBERTS P. V., MUNZ C., DÄNDLIKER P. : 1984

Modeling volatile organic solute removal by surface and bubble aeration. *J. Water Pollut. Fed.*, 56 ; p 157 - 163.

ROGERS K. R. : 1995

Biosensors for environmental applications. *Biosens. & Bioelectr.*, 10 ; p 533 - 541.

ROUILLON R., SOLE M., CARPENTIER R., MARTY J-L. : 1995

Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B.*, 26-27 ; p 477 - 479.

ROUSSEL M. : 1994

Analyse et interprétation d'images appliquées aux algues microscopiques. *Thèse de l'Université Technologique de Compiègne*.

RUTH B. : 1994

Direct observation of herbicide action in algae using 10 μ s resolved chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Arch. Hydrobiol.*, 131 (3) ; p 297 - 308.

SAMSON G., POPOVIC R. : 1988

Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 16 ; p 272 - 276.

SANTARIUS K. A. : 1990

Freezing of isolated thylakoids membranes in complex media. V. Inactivation and protection of electron transport reaction. *Photosynthesis Research*, 23 ; p 49 - 58.

SCALLA R. : 1991

Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. Ed. Inra, Paris.

SGHERRI C., PINZINO C., NAVARI-IZZO F. : 1993

Chemical changes and O_2^{\bullet} production in thylakoid membranes under water stress. *Physiologia Plantarum*, **87**; p 211 - 216.

SHIGEOKA T., SATO Y., TAKEDA Y., YOSHIDA K., YAMAUCHI F. : 1988

Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris* and quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7** ; p 847 - 854.

SHIOI Y., SASA T. : 1979

Immobilization of photochemically-active chloroplasts onto diethylaminoethyl-cellulose. *FEBS Letters*, **101** (2) ; p 311 - 315.

TAMURA T., SATO A., HARA M., ASADA Y., MIYAKE J. : 1994

Herbicide assay by use of a simple photocell. *Biotechnology Techniques*, **8** (9) ; p 615 - 618.

TANDEAU DE MARSAC N. : 1993

Les algues bleues d'autrefois : art ou génie ? *Biofutur*, **121** ; p 39 - 40.

THOMAS C. R. : 1993

Application of image analysis in biotechnology (XVI Conférence Internationale des Industries Chimiques). *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **24** ; p 17 - 29.

THOMASSET B., THOMASSET T., VEJUX A., JEANFELS J., BARBOTIN J-N., THOMAS D. : 1982

Immobilized thylakoids in cross-linked albumin matrix. *Plant Physiol*, **70** ; p 714 - 722.

TOMULKA K. W., Mac GEE D. J., LANGE J. H. : 1993

Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, **51** ; p 538 - 544.

TRAN-MINH C. : 1991

Les Biocapteurs. Principes, Réalisations et Applications. Ed. Masson, Paris.

TRAN-MINH C. : 1993

Biosensors. Ed. Chapman & Hall, London.

TREMOLIERES A. : 1998

Les lipides : des agents de plus en plus actifs de la vie cellulaire. *Analisis Magazine*, **26** (3) ; p 19 - 25.

UPDIKE S. J., HICKS G. P. : 1967

The enzyme electrode. *Nature*, **214** ; p 986 - 988.

VANROLLEGHEM P. A., KONG Z., ROMBOUTS G., VERSTRAETE W. : 1994

An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **59** ; p 321 - 333.

VECHT- LIFSHITZ S., ISON P. I. : 1992

Biotechnological application of image analysis : present and futur prospect. *Journal of Biotechnology*, **23** ; p 1 - 18.

VIVIER H., PONS M. N. : 1994

Application de l'analyse d'images dans *Capteurs et Mesures en Biotechnologie*. Ed. Lavoisier, Paris.

VIHNALEK V. : 1989

Morphology of algal cells related to growth conditions. *Acta Stereol*, **8** (1) ; p 27 - 30.

WEIL J. H. : 1990

Biochimie générale, 6° édition. Ed. Masson, Paris.

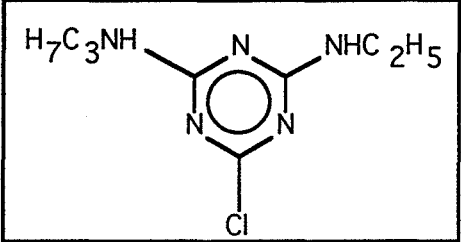
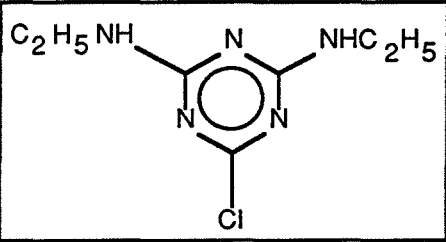
WESTON L. H., ROBINSON P. K. : 1991

Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence. *Biotechnology Techniques*, **5** (5) ; p 327 - 330.

ANNEXES

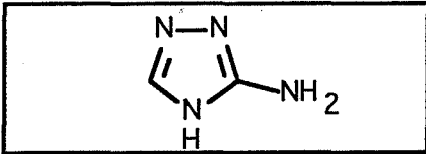
Annexe 1 : Toxiques

Herbicides

	ATRAZINE	SIMAZINE
Formule	$C_8 H_{14} Cl N_5$ 2 - Chloro - 4 - isopropylamino - 6 - éthylamino - 1, 3, 5 triazine 	$C_7 H_{12} Cl N_5$ 2 - Chloro - 4,6 - bis (éthylamino)- 1, 3, 5 triazine 
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 215,69 g - Solubilité dans l'eau 32 mg.L⁻¹ à 25° C - Constante loi Henry : 2,5 10⁻⁷ atm.m³.mole⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 201,6 g - Solubilité dans l'eau 5 mg.L⁻¹ à 20° C - log P : 1,94
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> - Famille des triazines - Très utilisé pour la culture du maïs - Usage réglementé depuis 1990 : 1500 g à l'hectare 	<ul style="list-style-type: none"> - Famille des triazines - Utilisé pour le désherbage des vignes, rosiers, arbres fruitiers
Détection dans l'eau	- HPLC - (Détection UV)	- HPLC - (Détection UV)
Réglementation	<ul style="list-style-type: none"> - Norme européenne eaux potables 0,1 µg.L⁻¹ - Recommandation OMS 2 µg.L⁻¹ - DJA : 0,00005 mg.kg⁻¹.j⁻¹ - LMR : 0,05 mg.kg⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - Recommandation OMS eaux potables 17 µg.L⁻¹ - DL₅₀ pour le rat : >5000 mg.kg⁻¹ - LMR : 0,1 mg.kg⁻¹
Stabilité	- Stable en conditions neutres, faiblement acides et alcalines	- Persistant plusieurs mois dans le sol

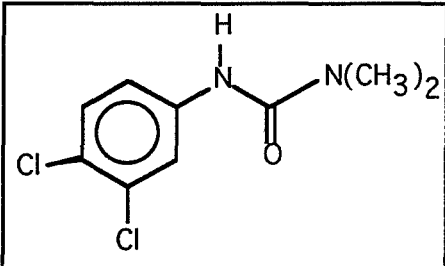
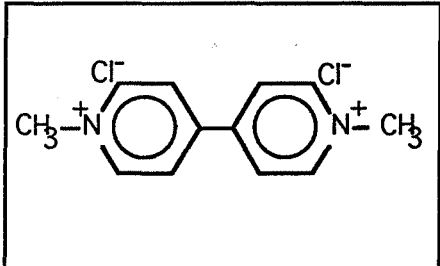
Annexe 1 : Toxiques

Herbicides

	GLYPHOSATE	AMINOTRIAZOLE
Formule	$C_3 H_8 NO_5 P$ N - (phosphonométhyl) glycine $H_2O_3P-CH_2-NH-CH_2-COOH$	$C_2 H_4 N_4$ 3 - Amino - 1, 2, 4 - Triazole 
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 169,07 g - Solubilité dans l'eau : 10 g.L⁻¹ à 25° C - non volatil - log P : - 4 	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 84,08 g - Solubilité dans l'eau : 280 g.L⁻¹ à 25° C - Soluble dans les solvants alcooliques - Insoluble dans l'acétone - log P : - 0,8
Utilisations	- Herbicide organophosphoré actif sur tous les végétaux	- Herbicide non sélectif de post-levée
Réglementation	<ul style="list-style-type: none"> - LMR : 5 à 20 mg kg⁻¹ - DL₅₀ pour le rat : 4900 mg.kg⁻¹ - DJA : 0,05 mg kg⁻¹ j⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - DJA : 0,00003 mg kg⁻¹.j⁻¹ - LMR : 0,05 mg.kg⁻¹ - Activité antithyroïdienne - DL₅₀ pour le rat : 14,7 kg⁻¹ (oral)
Stabilité	- Stable	- Stable à la lumière, à la chaleur

Annexe 1 : Toxiques

Herbicides

	DIURON	PARAQUAT
Formule	$C_9 H_{10} N_2 O Cl_2$ 3 - (3,4 - Dichlorophényl) - 1,1 diméthylurée 	$C_{12} H_{14} N_2 Cl_2$ 1,1 - Diméthyl - 4,4' dipyridylium ion 
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 233,10 g.L⁻¹ - Solubilité dans l'eau 42 mg .L⁻¹ à 25° C - log P : 2,8 	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 257,2 g.L⁻¹ - Solubilité dans l'eau : 700 ml.L⁻¹ à 20° C - Densité : 1,25 - Non volatil - Soluble dans les solvants alcooliques - Insoluble dans les hydrocarbures
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> - Herbicide puissant pour tous les végétaux verts et les algues, - Utilisé pour vignes, arbres fruitiers, canne à sucre... 	<ul style="list-style-type: none"> - Herbicide utilisé pour la vigne, arbres fruitiers - Usage réglementé (pulvérisation)
Détection dans l'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Pour l'eau et les extraits de sol : direct par HPLC - après hydrolyse en dichloroaniline, dosage par spectrophotométrie et CPG 	<ul style="list-style-type: none"> - Récupération sur filtre PTFE - Extraction par l'eau - Dosage par calorimétrie (dithionite) et chromatographique (CPG, HPLC)
Réglementation	<ul style="list-style-type: none"> - Non autorisé en Europe pour le milieu aquatique - DL₅₀ pour le rat : 3400 mg.kg⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - DL₅₀ pour l'homme : 20 mg.kg⁻¹ - DL₅₀ pour le rat : 157 mg.kg⁻¹ - DJA : 0,006 mg.kg⁻¹ par jour - LMR : 0,05 mg.kg⁻¹
Stabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Persistant (plusieurs années) - Plusieurs métabolites connus : dichlorophénylméthylurée, dichlorophénylurée, tétrachloroazobenzène - Dégradation microbienne possible - hydrolysé à la chaleur, en conditions alcalines ou très acides 	<ul style="list-style-type: none"> - Stable en conditions acides - Hydrolysé en conditions alcalines - Inactivé par matières inertes (argiles)

Annexe 1 : Toxiques

Métaux Lourds

	MERCURE chlorure mercurique	CADMIUM nitrate de cadmium
Formule	HgCl ₂	Cd(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 271,5g - Solubilité dans l'eau: 66 g.L⁻¹ à 20°C - Densité : 5,4 - Tension vapeur à 100°C : 13 Pa 	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 308,5 g - Solubilité dans l'eau: 2150 g.L⁻¹ à 20°C - Densité 1,1 - Tension de vapeur à 394°C : 1mmHg
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> - Industrie électrique (piles, lampes, contacteurs...) - Industrie chimique : cathode, liquide des cellules d'électrolyse - Fabrication instruments de mesure - Utilisation médicale : antiseptiques, amalgames 	<ul style="list-style-type: none"> - Industrie électrique : lampes, cellules photoélectriques - Fabrication d'alliages, de pigments - Le sel de nitrate est un précurseur des autres dérivés du cadmium : il entre dans la composition des émulsions photographiques
Détection dans l'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement sur support poreux, désorption thermique - Spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme - Electrode spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> - Spectrophotométrie d'absorption atomique - polarographie - HPLC - Méthode calorimétrique (réactif dithizone)
Réglementation	<ul style="list-style-type: none"> - VME : 0,1 ppm (composés minéraux du mercure) - DL50 : 0 à 40 mg .kg⁻¹ rat - Rejets industriels : 0,05 g.L⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - VME : 50 ppb (oxydes et sels solubles de cadmium) - Rejets industriels : 0,2 mg.L⁻¹ - 10 à 20 ppb OMS pour l'atmosphère urbaine
Stabilité	<p>Mercurure minéral métabolisé par les micro-organismes en composés organo-mercuriels stables : s'accumule facilement dans les chaînes alimentaires.</p>	<p>Cadmium largement présent dans l'environnement : air, eau, aliments, fumée du tabac, engrais, végétation.</p>

Annexe 1 : Toxiques

Solvants

	METHANOL	PERCHLOROETHYLENE
Formule	$\text{CH}_3 \text{ OH}$ Alcool méthylique	$\text{C Cl}_2 = \text{C Cl}_2$ Tétrachloroéthylène
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 32,04 g - Miscible - Densité : 0,79 - Constante loi Henry : $1,4 \times 10^{-4} \text{ atm.m}^3.\text{mole}^{-1}$ - Tension vap. sat. : 92 mm Hg 	<ul style="list-style-type: none"> - Masse molaire : 165,85 g - Solubilité dans l'eau: $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ à 20° C - Densité : 1,62 - Constante loi Henry : $1,4 \times 10^{-2} \text{ atm.m}^3.\text{mole}^{-1}$ - Tension vap. sat. : 18 mm Hg - log P : 1,94
Utilisations	<ul style="list-style-type: none"> - Solvant - Synthèse organique - Agent d'extraction (essence, huile) 	<ul style="list-style-type: none"> - Famille des COV - Synthèse organique - Nettoyage à sec - Dégraissage des pièces métalliques
Détection dans l'air	<ul style="list-style-type: none"> - Appareil Draeger - CPG 	<ul style="list-style-type: none"> - Appareil Draeger - CPG
Réglementation	<ul style="list-style-type: none"> - CMA : 200 mL.m^{-3} - VME (atelier) : 200 ppm 	<ul style="list-style-type: none"> - Recommandation OMS eaux potables $30 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ - DL50 pour le rat : 13 g.kg^{-1} - VME (atelier) : 50 ppm
Stabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Percolation dans les eaux - Volatile 	<ul style="list-style-type: none"> - Labile (air-eau) - Très volatile

Annexe 1 : Toxiques

Equivalence des Concentrations ppm - mole en Milieu Aqueux

PRODUIT	MASSE MOLAIRES (g)	CONCENTRATION MOLAIRE EQUIVALENTE à 1 ppm ($\times 10^{-6}M$)
Aminotriazole	84,08	11,8
Atrazine	215,7	4,6
Diuron	233,1	4,3
Glyphosate	169,1	5,9
Paraquat	311,2	3,2
Simazine	201,7	4,9
Méthanol	32	31,2
Perchloroéthylène	165,8	6
Cadmium (nitrate)	308	3,25
Mercure (chlorure)	271,5	3,7

1 ppm = 1 mg.L⁻¹

1 ppb = 1 µg.L⁻¹

Annexe 2 : Principe de la Fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse des atomes et molécules excités au préalable par absorption de lumière. La fluorescence est dite primaire lorsque les composés fluorescent naturellement ; c'est le cas des molécules de chlorophylles.

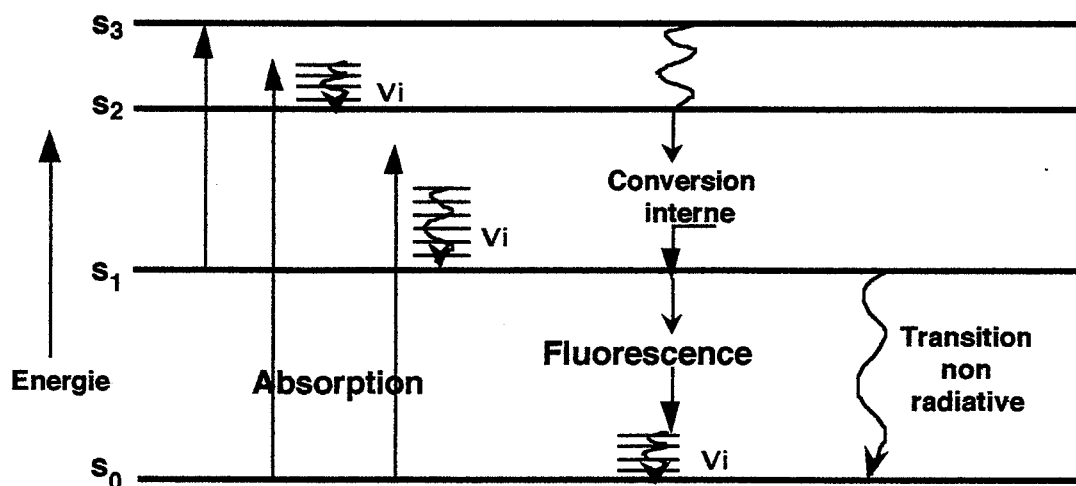
Pour les atomes, les phénomènes de fluorescence sont simples. L'absorption d'un photon par un atome libre provoque l'excitation de cet atome si l'énergie du photon est égale à la différence d'énergie de deux orbitales permises pour l'atome ; le passage d'un électron de valence de l'orbitale S_0 à une orbitale de plus haut niveau d'énergie (S_i) est transitoire et l'atome restitue un photon moins énergétique dans un laps de temps très court (10^{-15} s)

En fluorescence moléculaire, le principe reste le même : l'absorption du rayonnement électromagnétique par la molécule est suivie par la restitution, dans tout l'espace, d'une partie de l'énergie d'excitation.

L'énergie électromagnétique absorbée doit correspondre à la transition entre 2 niveaux d'énergie de la molécule c'est-à-dire à la transition du niveau fondamental (S_0) au premier état excité (S_1) et aux suivants (S_i). Ces niveaux sont eux-mêmes composés de plusieurs niveaux énergétiques représentant différents états de vibration et rotation de la molécule et échangeant facilement et rapidement de l'énergie entre eux.

Après illumination, le retour au niveau S_0 de la molécule s'effectue de plusieurs façons comme le montre la Figure ci-dessous. Il y a relaxation de vibration (v_i) au sein des différents S_i concernés et conversion interne ; la fluorescence accompagne la dissipation d'énergie thermique entre S_0 et S_1 . La fluorescence, au sein du premier état excité, ramène la molécule à l'état fondamental, en un temps court allant de 10^{-14} s à 10^{-8} s.

Le spectre d'émission ou spectre de fluorescence s'exprime par des bandes spectrales caractéristiques de la molécule. La fluorescence s'observe à une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde d'excitation. Lorsque l'énergie lumineuse absorbée par la molécule est en partie déviée vers d'autres voies que l'émission fluorescente, on parle d'extinction de la fluorescence ou quenching.



Voies de restitution de l'énergie par les molécules excitées.

Annexe 3 : Milieu de Culture

Milieu Oligo LC (LEFEBVRE-CZARDA) selon Norme ISO 8692 (1993) - T90-304

Matériel - eau Milli-Q (Millipore®),
- réactifs de qualité analytique,
- matériel non contaminant : verre.

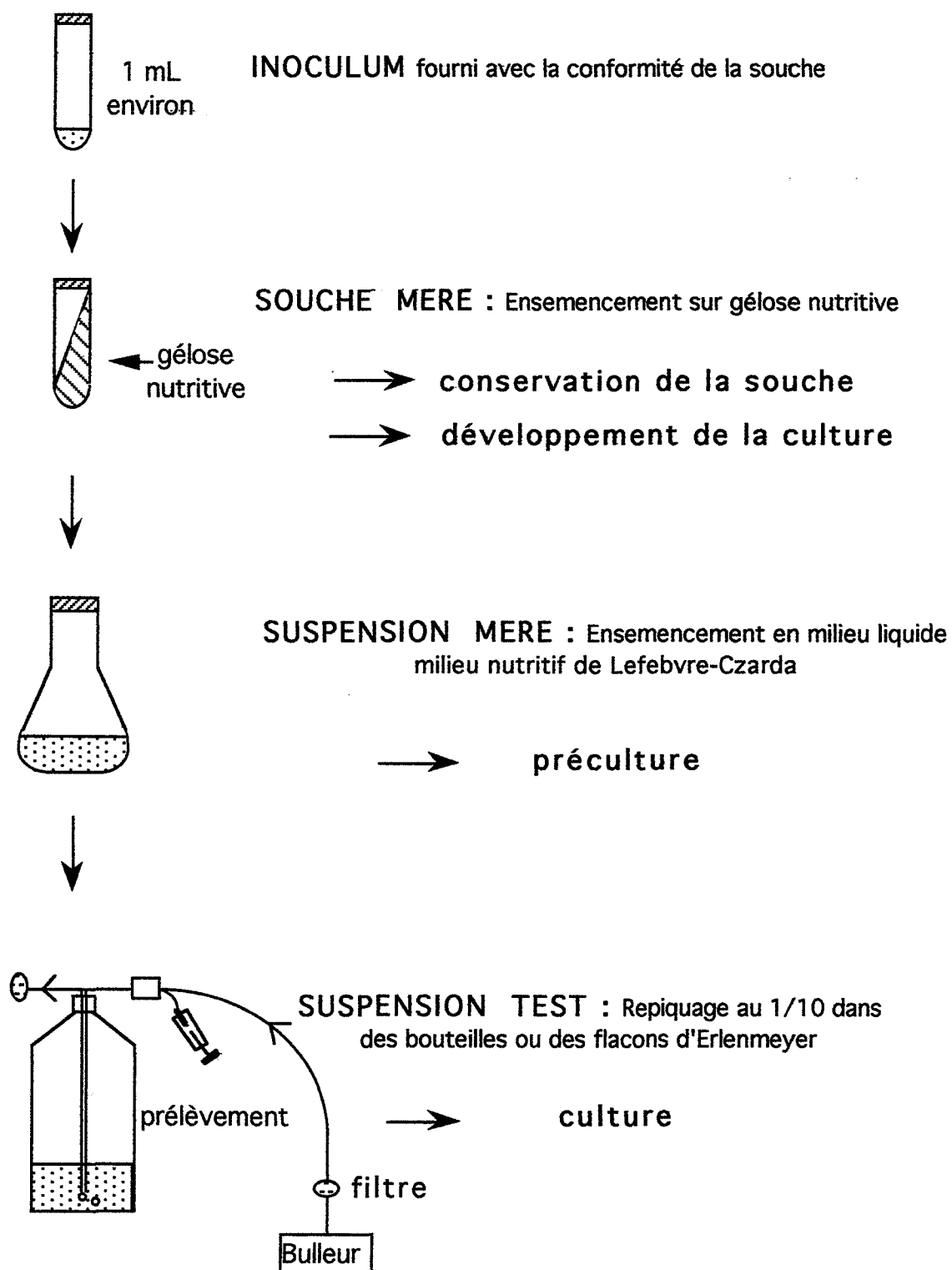
Pour obtenir 1 litre de milieu nutritif oligo LC, les solutions mères sont diluées 1000 fois pour les macro-substances et 5×10^4 fois pour les oligo-éléments.

Substance nutritive	Formule	Concentration solution mère
<i>Solution mère 1 = macro-substance</i>		
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 g.L ⁻¹
<i>Solution mère 2 = macro-substance</i>		
Nitrate de potassium	KNO_3	100 g.L ⁻¹
<i>Solution mère 3 = macro-substance</i>		
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30 g.L ⁻¹
<i>Solution mère 4 = macro-substance</i>		
Monohydrogénophosphate de potassium anhydre	K_2HPO_4	40 g.L ⁻¹
<i>Solution mère 5 = oligo-éléments-traces</i>		
Sulfate de cuivre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30 mg.L ⁻¹
Sulfate de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60 mg.L ⁻¹
Chlorure de cobalt	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60 mg.L ⁻¹
Nitrate de manganèse	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60 mg.L ⁻¹
Acide citrique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60 mg.L ⁻¹
Acide borique	H_3BO_3	60 mg.L ⁻¹
Heptamolybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60 mg.L ⁻¹
<i>Solution mère 6 = oligo-éléments</i>		
Citrate de fer (III)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,625 g.L ⁻¹
Sulfate de fer (II)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,625 g.L ⁻¹
Chlorure de fer (III)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,625 g.L ⁻¹

Stériliser le milieu nutritif à l'autoclave (120°C, 20 min),
Ajuster le pH à 7 à 0,1 près,
Conserver à 4°C, à l'obscurité.

Annexe 4 : Culture de *Chlorella vulgaris*

Développement et Maintenance de la Culture



Annexe 5 : Extraction des Thylakoïdes

Protocole Opératoire

Matériel

- Mixer de cuisine , Moulinex®
- Centrifugeuse (Model J2-21) , Beckman®
- Spectrophotomètre Uvikon® 860 , Kontron Instrument
- Toile de nylon (maille de 40 μm) , Prolabo®
- Unités de filtration réutilisables , Nalgène®
- Filtre en papier (porosité : 25 et 11 μm) , Whatman®

Réactifs

Tampon homogénéisation :

- 20 mM TES-NaOH , Sigma®
- 330 mM sorbitol , Sigma®
- 5 mM MgCl_2 , Prolabo®

le pH est ajusté à 7,5 avec de la soude normale.

Tampon suspension :

- 50 mM TES-NaOH pH 7,5
- 330 mM sorbitol
- 2 mM EDTA , Sigma®
- 2 mM MgCl_2 , Prolabo®
- 2 mM NH_4Cl , Prolabo®

Acétone , Prolabo®

Méthode adaptée d'après Hipkins [Hipkins, 1986]

Les feuilles d'épinards frais sont lavées à l'eau Milli Q® (système de filtration Millipore) et séchées sur du papier absorbant. Les plus grosses nervures sont enlevées ainsi que les morceaux de feuilles jaunes.

Elles sont ensuite broyées au mixer en présence du tampon homogénéisation. Le volume de tampon utilisé est proportionnel à la masse d'épinards. Le broyat est filtré sur la toile nylon, puis ce premier filtrat est lui même filtré sur papier Whatman (25 μm).

Ce second filtrat est centrifugé à 2500 tr.min^{-1} pendant 5 minutes à + 4°C.

Le culot est remis en suspension dans du tampon homogénéisation dilué 50 fois dans de l'eau : les chloroplastes isolés subissent le choc osmotique et libèrent les thylakoïdes.

La suspension est centrifugée à 9500 tr.min^{-1} pendant 10 minutes à + 4°C.

Le culot est remis en suspension dans 1 ml de tampon suspension. Puis la concentration en chlorophylles des thylakoïdes extraits est dosée suivant une méthode couramment utilisée [Arnon, 1949]. On ajuste la quantité de feuilles d'épinard broyées de manière à obtenir une solution de chlorophylles riche de 2 mg.mL.

Annexe 6 : Fluorescence des Suspensions Algales

Test de Toxicité par Fluorimétrie sur des Suspensions de *Chlorella vulgaris*

Conditions opératoires

- cuve Elkay (polyacrylate) avec couvercle de 4 ml
- fluorimètre Perkin Elmer 204
- suspensions algales dans milieu LC de DO760 = 0,15
- pH = 7
- température 20° C

Les algues sont maintenues 15 minutes à l'obscurité et éclairées pendant 1 minute lors des mesures.

Résultats

PRODUIT	RÉSULTAT, EFFET OBSERVABLE
Nitrate de cadmium	Pas d'effet après 1 heure pour 1 ppm
Chlorure mercurique	$I = 10\%$ après 1 heure $I = 75\%$ après 4 heures } pour 1 ppm
Diuron	Effet stimulant - instantané - Linéarité sur 2 décades Limite de détection = $0,2\mu\text{M}$ $\text{CE}_{50} = 5\mu\text{M}$
Atrazine	Effet stimulant - instantané Limite de détection = $0,2\mu\text{M}$ $\text{CE}_{50} = 2\mu\text{M}$
Simazine	Effet stimulant-Temps de réaction 5 minutes - Linéarité sur 2 décades Limite de détection = $0,02\mu\text{M}$ $\text{CE}_{50} = 3,5\mu\text{M}$
Aminotriazole	Pas d'effet après 3 heures pour 10^{-4} M
Glyphosate	Effet inhibiteur qui s'aggrave au cours du temps Limite de détection = $0,5\text{ mM}$ $\text{CI}_{50} = 50\text{ mM}$ } après 1 heure
Paraquat	Effet inhibiteur irréversible, tracé plat Limite de détection = $0,01\mu\text{M}$ $\text{CI}_{50} = 10^{-2}\text{ M}$ après 5 h si obscurité et après 2 h si lumière intermittente
Perchloroéthylène	Effet immédiat irréversible dès 5 minutes $\text{CI}_{50} = 0,1\% \text{ v/v}$
- solutions sursaturées	Tracé plat, inhibiteur
- solutions sous saturées	Signal d'allure physiologique - inhibiteur Limite de détection = 15 ppm $I = 30\%$ pour 150 ppm } après 15 minutes

Annexe 7 : Lixiviats de Bois

**Caractérisation des Solutions Obtenues par Lixiviation
d'Echantillons de Bois selon la Norme Afnor X31-210 /
Décembre 1992**

BOIS			LIXIVIAT		
Essence	Traitement	Dénomination	Couleur	Aspect	pH
PIN <i>Pinus</i> <i>sylvestris</i>	sans	"naturel"	faiblement coloré	limpide	4,5
	thermique	"rétifié"	jaune clair	limpide	3,7
	chimique	"imprégné"	incolore	limpide	5,2
SAPIN <i>Abies</i> <i>alba</i>	sans	"naturel"	incolore	limpide	5
	thermique	"rétifié"	incolore	limpide	4,2
	chimique	"imprégné"	incolore	limpide	4,7

Annexe 8 : Observation Microscopique des Chlorelles

Protocole de préparation des micro-algues pour l'observation au microscope électronique à balayage

Réactifs

- *Glutaraldéhyde, solution aqueuse à 25 % v/v- SIGMA (G 5882)*
- *Tétraoxyde d'Osmium, solution aqueuse à 4 % w/w- SIGMA (O 0631)*
- *Ethanol, alcool éthylique absolu grade spectrophotométrique- CARLO ERBA*

Méthode

1/ Dépôt de la suspension algale diluée sur support Anodisc par filtration sous vide modéré.

2/ Fixation : la membrane algale est laissée 20 minutes dans du milieu de culture additionné de glutaraldéhyde à 1 % (v/v).

3/ Rinçage : 3 bains dans le milieu de culture, 10 minutes chacun.

4/ Post-fixation : la membrane algale est déposée dans du milieu de culture additionné de tétraoxyde d'osmium à 1 % (v/v) pendant 30 minutes à l'obscurité.

5/ Rinçage: 1 passage (5 minutes) et 2 bains (10 minutes) dans le milieu de culture.

6/ Déshydratation : la membrane algale est transférée dans des solutions successives de plus en plus concentrées en éthanol (20 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 %).

Temps : 10 minutes pour chaque bain.

7/ Séchage spontané à l'air.

8/ Métallisation à l'or.

Annexe 9 : Analyse d'Images

Principes et Méthodes de l'Analyse d'Images

L'analyse d'images rassemble les concepts de morphologie mathématique et les procédés informatiques permettant d'extraire et de quantifier les informations d'une image. Elle comprend deux groupes de méthodes selon qu'elles concernent l'identification des formes par comparaison à des images types (reconnaissance des formes) ou l'analyse morphologique de structures quantifiées par des paramètres (analyse quantitative d'images).

Les informations proviennent principalement de deux ouvrages [Coster et Chermant, 1985 ; Vivier et Pons, 1994].

Les principales étapes d'une procédure d'analyse d'images sont :

♦ *L'acquisition de l'image*

L'acquisition de l'image vidéo requiert des conditions d'illumination et de grossissement optique de l'objet propices à la mise en évidence des caractéristiques recherchées sur les objets analysés. L'étape de prise de vues est d'une importance capitale pour l'exploration ultérieure de l'image et un grand soin doit donc être accordé à la résolution des problèmes pratiques rencontrés lors de cette phase. Le système de capture est généralement constitué d'une caméra vidéo à tube ou CCD (Charge Coupled Device). Le menu interactif du logiciel utilisé propose des sous-menus établissant des connexions entre l'analyseur d'images d'une part, le mode de synchronisation de la caméra et le PC compatible d'autre part. Les images acquises par l'intermédiaire de la caméra peuvent être traitées immédiatement ou stockées après numérisation sur le disque dur du micro-ordinateur pour leur utilisation ultérieure.

La numérisation : une carte de numérisation transforme ensuite le signal analogique vidéo en données numériques [Mantripragada, 1990]. L'image vidéo est décomposée en une grille de points, appelés "pixels" (picture elements), affectés d'une valeur correspondant à l'intensité lumineuse mesurée en chacun de ces points. Les images en noir et blanc ou monochrome peuvent être digitalisées par une mesure unique de l'intensité (le niveau de gris) alors que les images couleur nécessitent une mesure de l'intensité à trois longueurs d'ondes (rouge, vert, bleu). Le format de numérisation le plus courant correspond à une grille de 512 x 512 pixels, affectés chacun d'une valeur entière sur une échelle d'intensité lumineuse de 0 à 255. Une telle image occupe 256 kilo-Octets de mémoire. Toute transformation ultérieure de l'image se traduit par une transformation mathématique de chacune des valeurs des pixels composant l'image. L'opération de transformation doit donc être répétée 262144 fois (512 x 512). Ceci exprime clairement que le développement des applications de l'analyse

Annexe 9 : Analyse d'Images

d'images a largement été conditionné par l'augmentation de la vitesse et de la taille mémoire des ordinateurs. L'étape de numérisation aboutit à la représentation d'un objet issu d'un espace continu (une image) dans un espace discrétisé (les pixels) [Jackman, 1989].

♦ *Le seuillage*

Après les phases d'acquisition et de numérisation, certaines opérations peuvent être réalisées de façon à améliorer la qualité de l'image et à en faire ressortir les caractéristiques ou les zones à analyser.

Le seuillage consiste en une transformation de l'image numérique en une image binaire, représentative de l'information pertinente et qui a pour effet de réduire considérablement la quantité d'informations à traiter. L'opérateur sélectionne les zones de l'image qui l'intéressent en fonction de leur niveau de gris. Après détermination d'un intervalle de valeurs (seuil inférieur et supérieur) sur l'échelle des niveaux de gris, on ne retient à l'issue du seuillage que les pixels dont l'intensité est comprise dans cet intervalle.

On attribue la valeur 1 (noir) à la zone sélectionnée, et la valeur 0 (blanc) aux autres zones, d'où une image binaire.

♦ *Le traitement de l'image*

Il s'agit d'améliorer l'image binaire pour en faire ressortir les caractéristiques qui devront être analysées. Cette étape comprend la réduction du bruit de fond, l'élimination des zones non représentatives, la séparation des objets à mesurer du fond de l'image . Des sources de distorsion sont inévitables dans les images. D'une part, des altérations sont dues aux appareillages utilisés, que ce soit au niveau de l'électronique ou au niveau de la microscopie. D'autre part, la qualité des préparations influe sur les images. Il n'est pas simple de prendre une image en deux dimensions d'un objet en trois dimensions ; du fait de l'épaisseur du film de solution emprisonné entre lame et lamelle, les objets ne figurent pas dans le même plan focal, certains nets, d'autres flous [Roussel, 1994].

Le seuillage ne permet pas d'isoler parfaitement les objets. Généralement, l'intervalle de niveaux de gris nécessaire à la sélection complète des objets englobe des zones non représentatives qui apparaîtront comme autant d'objets parasites sur l'image binaire.

Le programme de traitement comporte trois phases exécutées indépendamment.

Suppression des bords : certains objets contenus dans l'image binaire peuvent toucher les bords. Ils ne sont que le reflet d'une information tronquée lors de l'acquisition, et propres à

Annexe 9 : Analyse d'Images

introduire des erreurs lors de l'analyse. La fonction suppression des bords permet de supprimer des objets touchant les bords de l'image.

Bouchage des trous : une image binaire est constituée d'un certain nombre d'objets. Ce sont ici des algues de taille variée ; les micro-algues de grande taille, en cours de division, présentent des trous en raison d'une forte différence de contraste entre l'extérieur et l'intérieur de la tétrade. La fonction bouchage des trous permet de combler ces zones sombres et de restaurer l'objet, à condition que ces trous ne représentent pas l'information pertinente.

Segmentation : cette opération vise à séparer deux ou plusieurs objets contigus, présents dans l'image binaire. Il faut noter que cette fonction est très difficile à réaliser en traitement d'images. En effet, elle nécessite une connaissance *a priori* de l'objet. Par exemple, un opérateur est capable de distinguer nettement un objet étranglé de deux objets distincts qui se touchent. La machine, elle, ne peut se référer qu'à des critères préprogrammés. Il se peut donc que l'opération de segmentation se déroule parfaitement sur certains objets et soit inefficace sur d'autres. C'est un problème rencontré avec les cellules-filles qui sont souvent proches en fin de la division cellulaire.

♦ L'analyse de l'image

La dernière étape est l'étape de caractérisation et de mesure. Elle consiste en la mesure des paramètres caractérisant les objets retenus sur l'image binaire traitée, elle est suivie suivie d'un traitement des données [Mantripragada, 1990].

Le programme utilisé propose un catalogue de paramètres :

- * Nombre d'objets présents dans l'image binaire
- * Aire de chaque objet
- * Périmètre
- * Facteur de forme circulaire (donne l'analogie d'un objet à un cercle)

Plus un objet est rond, plus son facteur de forme circulaire se rapproche de 1 :

$$C = 4 \pi (\text{aire}) / (\text{périmètre})^2$$

- * Diamètres de ferret

Ils désignent les mesures des projections de l'objet sur les axes X et Y (ce sont les dimensions du plus petit rectangle contenant l'objet).

PUBLICATIONS
EN LANGUE ANGLAISE
ISSUES DE CETTE ETUDE

Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours

Martine Naessens & Canh Tran-Minh*

Ecole des Mines, Centre SPIN, Laboratory of Biotechnology, 158 Cours Fauriel, 42023 Saint Etienne Cedex 2, France

(Received 8 July 1997; revised form received 17 October 1997; accepted 20 October 1997)

Abstract: A whole-cell biosensor has been designed to operate in the gas phase for determination of vapours of solvents. Methanol was chosen as an example of a volatile organic solvent to evaluate the algae sensor response. The use of whole cells as bioreceptors allows detection of those compounds in the gas phase without preliminary trapping of the analytes in a solution. In addition, near real-time monitoring is possible by the measurement of the algae photosynthetic activity with an oxygen electrode. © 1998 Elsevier Science S.A.

Keywords: whole-cell biosensor, algae, *Chlorella*, solvent, volatile organic compound, methanol, toxic gas determination

INTRODUCTION

The need for early-warning systems to detect toxic compounds is well established for the protection of the environment. The wide variety of chemical structures involved makes biosensors more effective than physico-chemical methods to assess the global toxicity of the various pollutants (Bitton, 1983; Evans *et al.*, 1986; Rogers, 1995; Paddle, 1996). Therefore, biosensors based on enzyme inhibition have been studied for the determination of the toxicity of different compounds dissolved in water (Tran-Minh, 1985).

Many toxic pollutants also exist in the form of gas or vapours. Their presence in the atmosphere requires a continuous monitoring in order to protect public health and to increase the safety of workers exposed to those chemicals in the workplace atmosphere. The direct measurement of their concentrations is often hindered with

enzyme biosensors which normally operate in aqueous solutions (Dennison *et al.*, 1996). Therefore, these gaseous compounds need to be previously trapped in an aqueous solution before being measured. This operation requires additional equipment, such as absorption columns, which delay and complicate the measurements particularly for slightly soluble substances.

The purpose of this work is to construct a biosensor working in the gas phase and capable of assessing the whole toxicity of solvents vapours in the atmosphere. The choice of algae as a bioreceptor is motivated by its current use in solution as a biotest for the evaluation of water quality (Pandard *et al.*, 1993). This whole cell can also be easily deposited on membranes to produce biosensors.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The algal membrane is obtained from filtration of an algal suspension on a glass microfibre

*Author to whom correspondence should be addressed

filter (Whatman). The concentration of algae in suspension is previously determined by optical density (OD). A typical 10 ml of a suspension of OD = 0.34 at 685 nm has been used for a 0.7 cm² membrane. Micro algae were cultivated in our laboratory: the *Chlorella vulgaris* strain (CCAP 211/12) was purchased from The Culture Collection of Algae and Protozoa at Cumbria, UK. Methanol of analytical grade was purchased from Janssen Chimica.

Preparation of the algae biosensor

The biosensor was constructed from the combination of an algae membrane associated with an oxygen electrode to measure the production of oxygen during the photosynthetic activity (Fig. 1). A Clark oxygen electrode E 5046-0 Radiometer was used as a transducer. It was connected to a potentiostat and amplifier Radiometer PHM 73 for pO₂ measurements. The responses were monitored with a recorder Sefram.

Algae photosynthetic activity is obtained by means of a light source, Schott KL 1500 Electronic, equipped with an optical fibre. A programmer delivers flashes of light at regular intervals. These intermittent flashes of light are sent to the biosensor to start up the photosynthetic process. The light flash lasts 1 min followed by 5 min darkness. Oxygen produced during the illumination period was recorded as a peak on the recorder chart. In the absence of toxic vapour, the peaks of oxygen production are recorded and taken as a reference. When a toxic compound is introduced in the measuring cell, the photosynthetic activity changes which modifies the release of oxygen and consequently the peak height.

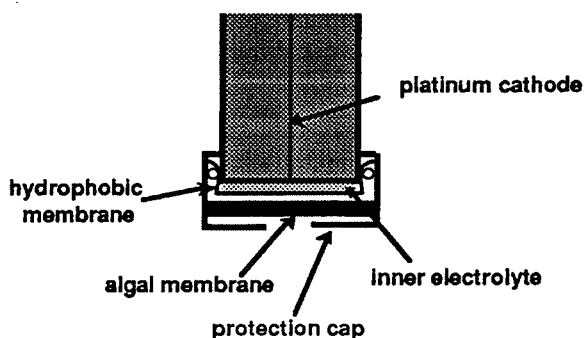


Fig. 1. Algal biosensor using a pO₂ electrode for direct determination of solvent vapours.

Measurement of toxicity

When used to detect vapours, a glass measuring cell 3.5 ml in volume is designed with two main openings: one to accommodate the biosensor, the other fitted with a teflon stopper and a syringe is used to introduce the liquid solution containing the volatile analyte (Fig. 2). The cell temperature is maintained at 20°C with a water thermostat. The pressure in the cell is kept identical to the outer atmospheric pressure by means of a capillary tubing. The biosensor is placed just above the solution which is homogenized by a magnetic stirrer: it is connected to a pO₂ measuring unit. Periodic flashes of light are sent to the biosensor down an optical fibre placed outside the measuring cell and connected to a light source. The light beam passes through the transparent cell glass wall and reaches the algal sensitive membrane. The remaining part of the cell wall is covered with aluminium foil to prevent interference from other light sources. Distilled water (1.2 ml) is first introduced in the cell to determine the oxygen peak reference response then various amounts of methanol are injected with a syringe to the stirred solution. After each injection, a change in peak height is immediately observed. This biosensor response is then expressed as a function of methanol vapour concentration. The methanol concentration in the gas phase in volume part per million (ppm) is calculated from the methanol concentration in the liquid phase using Henry's law (Roberts *et al.*, 1984).

After measurement, the whole solution is withdrawn by suction with a water jet pump and rinsed three times with water. This aspirator system also removes the solvent vapour.

RESULTS AND DISCUSSION

Operating conditions of the algal biosensor

Biosensors are generally designed to work in solution where bioreceptors are in their natural environment. However, some biological systems can operate in gaseous systems provided that they are sufficiently hydrated. Humidity in atmosphere is often acceptable to the growth of certain microorganisms or the integrity of whole cells. Most microalgae are present in water but some *Chlorella* strains grow in a subaerial system (trunk of trees) and only require atmospheric humidity. In

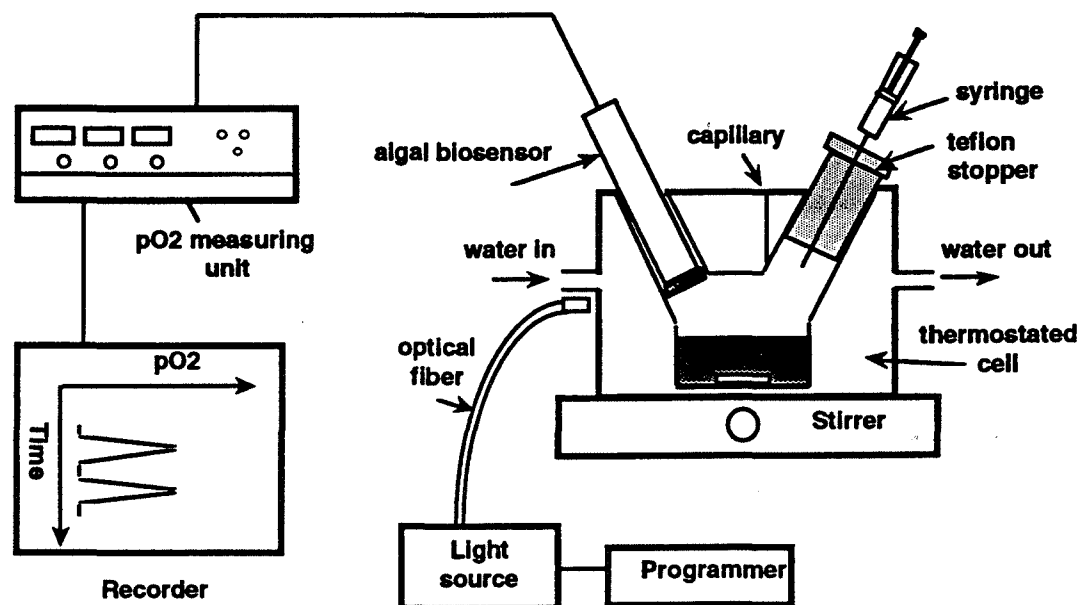


Fig. 2. Experimental set-up using an algal biosensor for direct determination of solvent vapours in atmosphere.

the case of our biosensor, the water saturated atmosphere close to the sensitive membrane of the transducer prevents evaporation of the inner electrolyte solution and allows the oxygen electrode to operate properly (Fig. 1).

Biosensor response to light

To evaluate the algal membrane photosynthetic activity, intermittent flashes of light are sent to the sensitive tip of the biosensor in the absence of toxic species. As soon as the sensor receives the light energy, oxygen is immediately produced and an increase of oxygen pressure can be seen on the recorder (Fig. 3). One minute later, the light is switched off during 5 min by the programmer and a decrease in oxygen pressure is observed. A peak height of oxygen is then recorded and taken as a reference. The peak height depends on the illumination period. The illumination period is not long enough to allow the maximum peak height to be achieved: it is reduced to have a rapid response time and high rate of measurement. The light intensity is also limited to protect the algal cells from irreversible damage: it can be modulated by the electrical voltage sent to the lamp or by the distance from the optical fibre to the membrane sensor. The illumination cycle is repeated several times to assess the repeatability of the biosensor response.

The standard deviation is 1.1% for a repeatability test on 10 consecutive measurements during 1 h.

Biosensor response to solvent vapour

Methanol is toxic to algal cells due to its dissolving power, so it is employed for chlorophyll extraction. Methanol was chosen because it is currently used for industrial organic synthesis, extraction in organic chemistry, solvents for painting and pharmaceuticals. In the workplace atmosphere, its concentration should not exceed 200 ppm for 8 h exposure. When liquid methanol is injected into the stirred water solution of the measuring cell, it solubilizes in the liquid phase and its vapour spreads in the gas phase. This equilibrium is reached rapidly since the production of oxygen during the illumination period immediately changes and a decrease in peak height is immediately observed (Fig. 3). This results from the action of the toxic vapour of methanol on the photosynthetic activity. The new value of peak height is recorded and compared to the reference one to calculate the percentage of inhibition.

The percentage of inhibition $I\%$ is defined as followed:

$$I\% = 100 \times \frac{(P_0 - P)}{P_0}$$

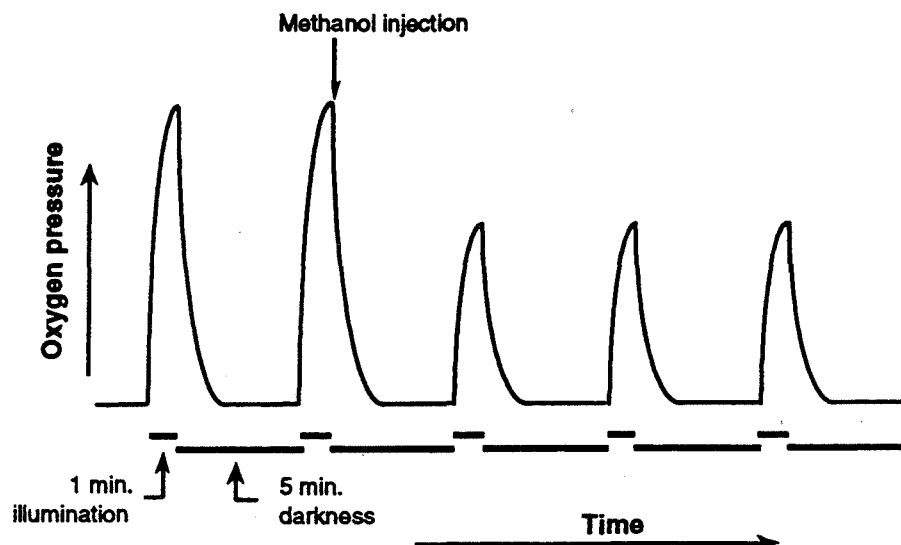


Fig. 3. Typical responses of the algal biosensor to solvent vapours.

where P_0 and P are the peak heights of oxygen pressure recorded in the absence and in the presence of the toxic compound respectively.

The detection limit is defined as the inhibitor concentration giving rise to a 5% reduction of the peak height and the EC_{50} concentration is defined as the vapour concentration which reduces 50% of the peak height of oxygen pressure. In the case of methanol, the detection limit is 30 ppm and the EC_{50} concentration is 790 ppm.

The biosensor response to various methanol vapour concentrations shown in Fig. 4 concerns the linear range with a correlation coefficient of $R = 0.99$. The percentage of inhibition is used since this relative value of response is independent of light intensity. The measurement is repeated three times for each concentration and the mean value is reported in the figure.

The response time can be assessed from the decrease in the peak height after introduction of methanol in the measuring cell. The methanol is injected immediately after the illumination period and the measurement is done after 5 min darkness. Since the steady state is reached after this time, it can be considered that the response time of the biosensor itself is less than 5 min for the tested concentrations (Fig. 4).

Reversibility of the algal biosensor response to methanol

After measurements of the biosensor response to methanol vapour, the methanol containing sol-

ution is withdrawn by suction, rinsed and replaced by a new distilled water. Methanol vapour is also removed at the same time by this procedure. The programmer is switched on again to produce a new set of intermittent flashes of light. Peaks of oxygen release again appear on the recorder. Those reference peak heights are compared to the previous one obtained before introducing methanol in the measuring cell. The photosynthetic activity is completely recovered if the same peak heights are again obtained in the absence of methanol.

The reversibility of the biosensor response to methanol is also tested with injection of various amounts of liquid methanol in the distilled water to produce the corresponding vapour concentrations. The same peak heights are obtained again for the same amount of methanol injected. The inhibition phenomenon is reversible up to 390 ppm methanol vapour concentration. The biosensor gives the same responses when re-challenged by methanol provided that the original challenge does not exceed 390 ppm. It can be concluded that the algal membrane is not damaged below this methanol concentration.

Stability of the biosensor response

The algal membrane stability depends on the illumination conditions. Light intensity should not be too high since it can damage the algal cells. On the other hand, it is known that those cells need to be periodically illuminated for its sur-

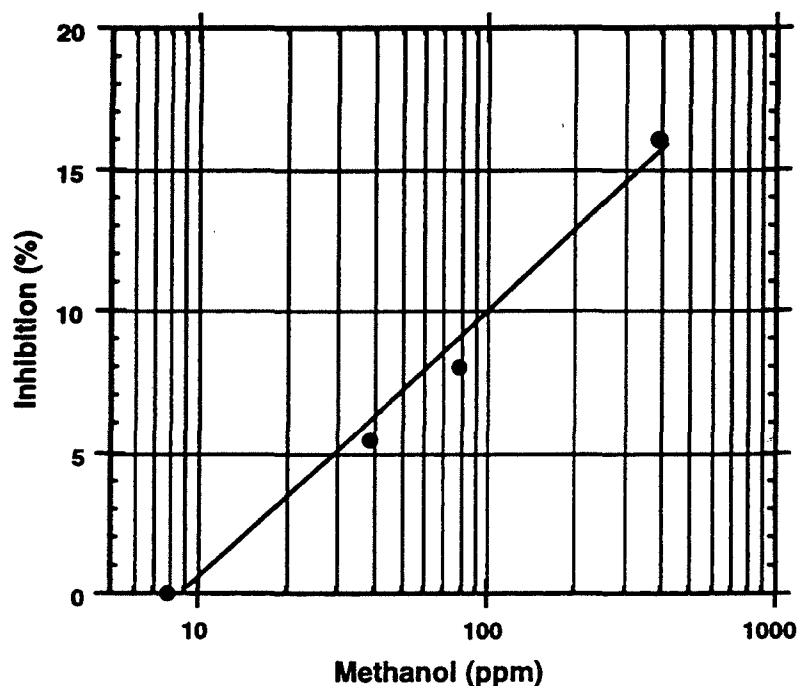


Fig. 4. Biosensor response expressed in percentage of inhibition, as a function of methanol vapour concentration.

vival. The illumination intensity should then be adjusted according to the response time and the rate of measurements required by a particular application.

Long term stability of the algal biosensor is monitored every day with distilled water to compare the reference responses. The biosensor continuously operates in the measuring cell at ambient temperature 24 h a day under intermittent flashes of light. The daily mean values of the measurements are reported in Fig. 5.

A decrease in oxygen production during the photosynthetic process is observed day after day. Under the above-mentioned conditions, more than 50% of the algal activity in terms of oxygen production still remains on the membrane biosensor after 10 days. This could be improved by decreasing the light intensity which results in a longer response time.

This decrease in oxygen production does not greatly affect the percentage of inhibition used for the methanol vapour determination since only the relative decrease of oxygen production in the presence of methanol is involved.

CONCLUSION

A whole-cell biosensor has been constructed in order to operate in the gas phase for determination of vapours of toxic solvents. Methanol is selected as an example to show the feasibility of the method. Preliminary experiments shows that a similar algal biosensor responds to other toxic compounds and can also operate in the open atmosphere and be able to detect gases and vapours at atmospheric concentrations. The use of algal membrane allows direct determination of those compounds in the gas phase without previously trapping the analyte in a solution. In addition, real-time monitoring is possible with continuous measurement of the algae photosynthetic activity by an oxygen electrode. This biosensor is also capable of assessing the whole vapour toxicity when many toxic solvents are present in the atmosphere. Therefore, it can be considered as an effective early-warning system to protect the environment.

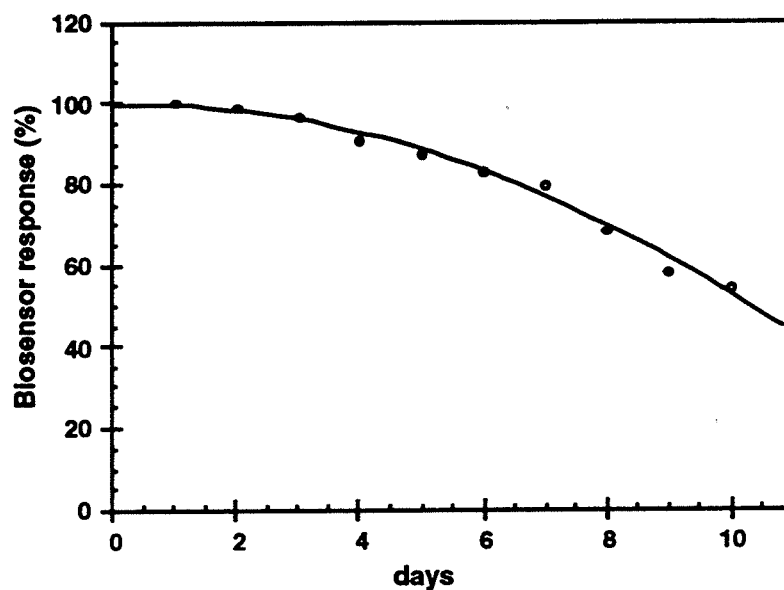


Fig. 5. Long term stability of the algal biosensor.

REFERENCES

- Bitton, G. (1983) Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment: a review. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* **13**, 51–67.
- Dennison, M. J., Hall, J. M. and Turner, A. P. F. (1996) Direct monitoring of formaldehyde vapour and detection of ethanol vapour using dehydrogenase-based biosensor. *Analyst* **121**, 1769–1773.
- Evans, G. P., Briers, M. G. and Rawson, D. M. (1986) Can biosensors help to protect drinking water. *Biosensors* **2**, 287–300.
- Paddle, B. M. (1996) Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics* **11**, 1079–1113.
- Pandard, P., Vasseur, P. and Rawson, D. M. (1993) Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Water Research* **27**, 427–431.
- Roberts, P. V., Munz, C. and Dändliker, P. (1984) Modeling volatile organic solute removal by surface and bubble aeration. *Journal of Water Pollution Federation* **56**, 157–163.
- Rogers, K. R. (1995) Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics* **10**, 533–541.
- Tran-Minh, C. (1985) Immobilized enzyme probes for determining inhibitors. *Ion-Selective Electrode Reviews* **7**, 41–75.



ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 364 (1998) 153–158

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

Whole-cell biosensor for determination of volatile organic compounds in the form of aerosols

Martine Naessens, Canh Tran-Minh*

Ecole des Mines, Centre SPIN, Laboratory of Biotechnology, 158 Cours Fauriel, 42023 Saint Etienne Cedex 2, France

Received 20 November 1997; received in revised form 14 January 1998; accepted 3 February 1998

Abstract

A biosensor using *Chlorella* microalgae immobilized on the membrane of an oxygen electrode has been designed to operate in the gas phase for determination of volatile organic compounds in the form of aerosols. Perchloroethylene (tetrachloroethylene) is used as an example to produce aerosols and vapours since it is toxic to the people working in dry-cleaning atmospheres and municipal treatment plants. A home-made controlled atmosphere chamber is constructed for perchloroethylene detection. Monitoring of perchloroethylene is achieved by the measurement of oxygen production during the algae photosynthetic process. The use of whole cells as bioreceptors allows the detection of a toxic aerosol in the gas phase without preliminary trapping of the analyte in a solution. © 1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: Biosensor; Whole-cell; Algae; *Chlorella*; Solvents; Aerosol; Perchloroethylene; Tetrachloroethylene; Volatile organic compounds

1. Introduction

There is a need to monitor levels of exposure of workers to potentially harmful toxic compounds in the form of aerosols in the workplace atmosphere. The sampling/analysis procedure is not adapted to warn workers of imminent exposure so that immediate action can be taken to evacuate the workplace and to locate the source of release. Biosensors as a warning device appear to be more efficient for the rapid detection of toxic chemicals [1–4] but they are restricted to species in aqueous solutions [5,6]. The direct measurement of their concentrations with

enzyme biosensors is hindered because they normally operate in aqueous solutions [7]. Therefore, these gaseous compounds need to have been previously trapped in an aqueous solution before being measured. This operation requires additional equipment such as absorption columns which delay and complicate the measurements particularly for slightly soluble substances.

Our aim is to construct a biosensor working in the gas phase and capable of determining the concentration of a toxic chemical such as perchloroethylene present in the form of an aerosol. The choice of algae as a bioreceptor is motivated by its current use in solution as a biotest for the evaluation of water quality [8–10]. This whole cell can also be easily produced and immobilized on transducer membranes.

*Corresponding author. Tel.: +33 477 4200 33; fax: +33 477 4200 00; e-mail: tran@emse.fr

2. Experimental

2.1. Materials

The active membrane is constructed by physical entrapment of the algal cells onto a porous matrix of appropriate pore size. The immobilization is achieved by simple filtration of an algal suspension on a glass microfibre filter (GF/C Whatman). The thickness of the algal layer depends on the concentration of algae in suspension which is determined by the absorbance (A). An optimized amount of an algae suspension (10 ml) corresponding to $A=0.34$ has been used for a 0.7 cm^2 membrane. Microalgae were cultivated in our laboratory: the *Chlorella vulgaris* strain (CCAP 211/12) was purchased from The Culture Collection of Algae and Protozoa at Cumbria, UK.

Perchloroethylene (1,1,2,2-tetrachloroethane) of spectrophotometric grade was purchased from Janssen Chimica. Perchloroethylene is a volatile organic compound (VOC) often used in the form of vapour or aerosol for dry-cleaning and in municipal treatment plant. Perchloroethylene has so far been detected by using thermal desorption and gas chromatographic techniques [11].

2.2. Experimental set-up

The biosensor was constructed from the combination of an algal membrane associated with an oxygen

electrode to measure the release of oxygen during photosynthetic activity (Fig. 1). A Clark oxygen electrode (E 5046-0, Radiometer) was used as a transducer. It was connected to a potentiostat and amplifier (Radiometer PHM 73) for $p\text{O}_2$ measurements. The responses were monitored with a chart recorder (Sefram). Since the algal membrane is designed to work in the gas phase, a water reservoir was fixed to the electrode body to provide humidity for the algal cells to operate properly.

Algal photosynthetic activity was measured by means of a light source (Schott KL 1500 Electronic) equipped with an optical fibre. A programmer delivered flashes of light at regular intervals. These intermittent flashes of light were sent to the biosensor to start up the photosynthetic process. The light flash lasts for 1 min followed by 5 min darkness. Oxygen produced during the illumination period was recorded as a peak on the recorder chart. In the absence of aerosol, the peaks of oxygen release were recorded and taken as a reference. When a toxic compound was sprayed in the controlled atmosphere chamber, the photosynthetic activity changed, which modified the release of oxygen and consequently the peak height.

2.3. Measurement of toxicity

An enclosed space was designed for aerosol detection. It consisted of a home-made box which provided a 0.7 m^3 controlled atmosphere chamber (Fig. 2). The

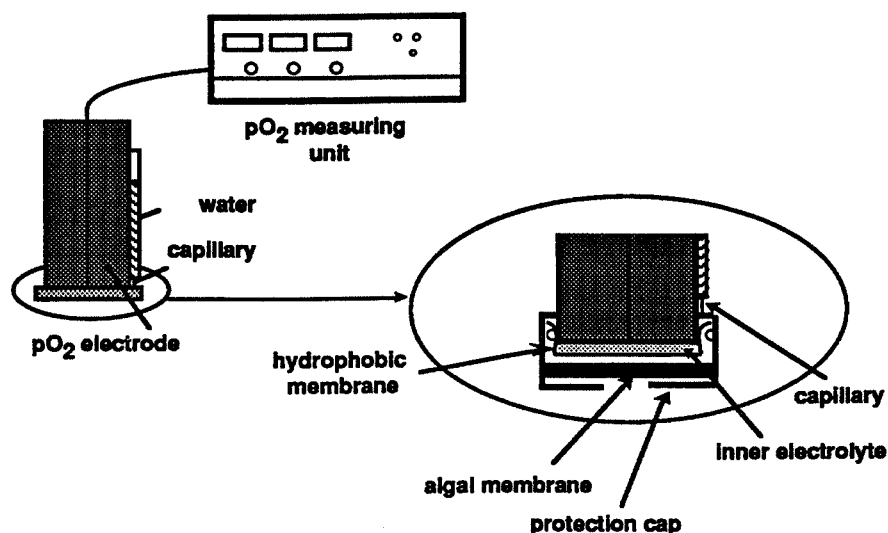


Fig. 1. Algal biosensor using a $p\text{O}_2$ electrode for direct determination of aerosols in atmosphere.

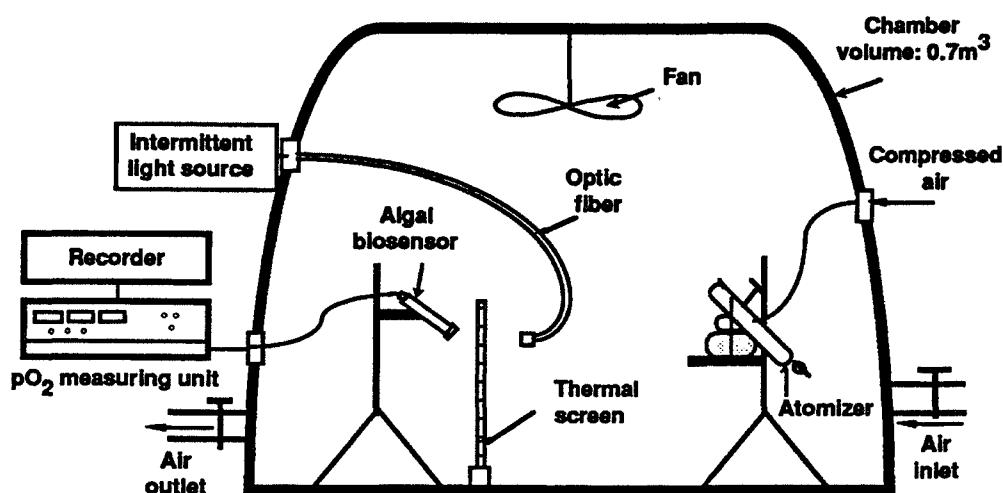


Fig. 2. Controlled atmosphere chamber for determination of aerosols with an algal biosensor.

wall was covered with aluminium foil to prevent interfering light entering from outside. A humidity-temperature sensor (Prolabo) monitored temperature and the degree of humidity inside the chamber: the temperature was maintained at 20°C and the relative humidity at 75%. The biosensor was placed in the box under an electric fan which is fixed at the top. The biosensor was connected to an oxygen measuring device outside the chamber.

An Atrium atomizer placed ca. 50 cm from the biosensor, delivered a spray of very fine drops like a mist of either water or toxic chemicals in the atmosphere. Inside the chamber, an optical fibre was oriented so that the light beam reached the sensitive part of the biosensor: the fibre was connected to a light source placed on the outside. Periodic flashes of light were sent from the optical fibre to the sensor through a thermal screen which prevented any heating of the biosensor by the light. The thermal screen was made of a 1 cm water layer surrounded by two parallel glass plates. Before measurements, atmospheric humidity in the chamber was manually adjusted by spraying an appropriate quantity of water from the atomizer. The photosynthetic activity was not inhibited by water vapour since it was not toxic for the algal cells, but its partial pressure was maintained constant for the oxygen electrode to operate properly. To determine pollutants, a definite amount of toxic chemical is sprayed into the enclosed space whose atmosphere was continuously homogenized with the electric fan. After the measurements, the toxicant-containing

atmosphere was completely removed through a large flexible tube (inner diameter 10 cm) connected to an air pump (S&P TD160).

3. Results

3.1. Operating conditions of the algal biosensor

Biosensors are generally designed to work in solution where bioreceptors are in their natural environment. However, some biological systems can operate in gaseous systems provided that they are sufficiently hydrated. Humidity in the atmosphere is often acceptable for the growth of certain microorganisms or the integrity of whole cells. Most microalgae are present in water but some *Chlorella* strains grow in subaerial systems (trunks of trees) and only require atmospheric humidity. In the case of our biosensor, the algae are continuously hydrated by a capillary connected to a water reservoir fixed onto the electrode body (Fig. 1). This local water-saturated atmosphere close to the sensitive membrane of the transducer also prevents evaporation of the inner electrolyte solution and allows the oxygen electrode to operate properly.

3.2. Biosensor response to light

To evaluate the algal membrane photosynthetic activity, intermittent flashes of light are sent to the

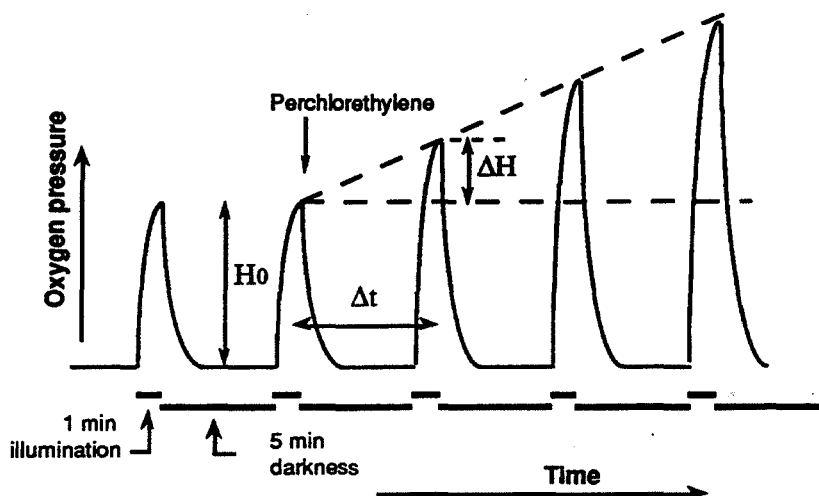


Fig. 3. Typical responses of the algal biosensor to perchloroethylene aerosols.

sensitive tip of the biosensor in the absence of toxic species. As soon as the sensor receives the light energy, oxygen is immediately produced and an increase of oxygen pressure can be seen on the recorder (Fig. 3). One minute later, the light is switched off for 5 min by the programmer and a decrease in oxygen pressure is observed. A peak height H_0 of oxygen is recorded and taken as a reference. The peak height depends on the illumination period. This cycle is repeated several times to assess the repeatability of the biosensor response.

3.3. Biosensor response to aerosols

Perchloroethylene is used to produce aerosols. Perchloroethylene is presented as an example of a volatile organic compound which is toxic in the form of vapour or aerosol to the people working in a dry-cleaning atmosphere or municipal treatment plant. It also affects the photosynthetic activity of algal cells. When perchloroethylene is sprayed into the chamber, the production of oxygen during the illumination period immediately changes and an increase ΔH in peak height is immediately observed (Fig. 3). During the first ca. 15 min, the oxygen peak height increases linearly with time and the dynamic response is proportional to the concentration of perchloroethylene in the chamber if those concentrations do not exceed 250 ppm (Fig. 4). The dynamic response is defined as the ratio of the increase in peak heights to the time course:

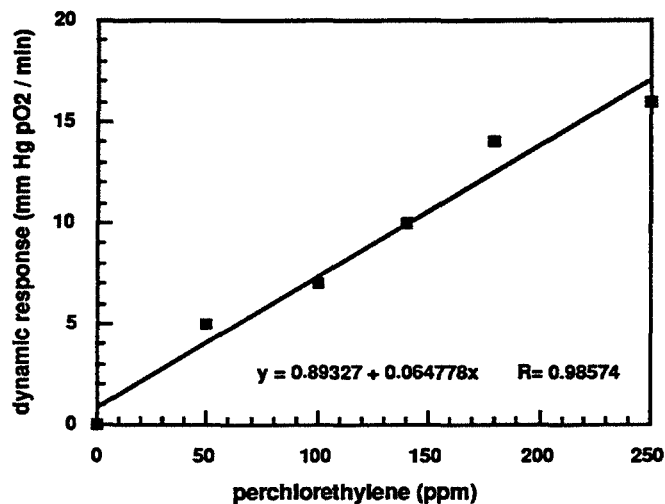


Fig. 4. Dynamic response of the biosensor as a function of perchloroethylene concentration.

$$\text{dynamic response} = \Delta H / \Delta t,$$

where $\Delta H = H - H_0$, $\Delta t = t - t_0$, H_0 is the reference response and t_0 corresponds to the time of introduction of perchloroethylene. The dynamic response is then the rate of oxygen production.

The response time can be assessed from the increase in the peak height after spraying perchloroethylene in the controlled atmosphere chamber. The perchloroethylene is sprayed immediately after the illumination period and the measurement is done after 5 min darkness. Since the slope response is unchanged after this first period of time, it can be considered that the

response time of the biosensor itself is less than 5 min for the tested concentrations (Fig. 3). The biosensor response depends on the thickness of the algal layer. Increasing amounts of immobilized microalgae result in higher response peaks due to increased photosynthetic activity. However, excess of microalgae reduces the peak heights because of diffusional limitations. A compromise has been adopted to immobilize the algal cells onto the filter membrane.

The dynamic response of the algal biosensor as a function of perchloroethylene concentrations is shown in Fig. 4. The calibration graph can be considered linear in the range 0–250 ppm of perchloroethylene. The correlation coefficient is shown in the graph for six data points. The measurement is repeated three times for each concentration and the mean value is reported in the figure. The detection limit of the biosensor is dependent on the detection limit of the transducer, which is the oxygen electrode. A concentration of 10 ppm perchloroethylene corresponding to a signal-to-noise ratio ($=3$) can be detected. As the limit value of workers exposure to perchloroethylene is 50 ppm [12], this biosensor could be used as an early warning device.

Perchloroethylene is toxic to algal cells by its dissolving effect on the cell membrane. However, these living cells have their repair system to restore the photosynthetic activity provided that they are exposed only to low concentrations of perchloroethy-

lene over short periods of time. The recovery of the biosensor activity is then dependent upon those exposure conditions. The biosensor is not reversible for perchloroethylene concentration >340 ppm.

3.4. Stability of the biosensor response

The algal membrane stability depends on the illumination conditions. Light intensity should not be too high since it can damage the algal cells. Also, it is known that those cells need to be periodically illuminated for their survival. The illumination intensity should be adjusted according to the response time and the rate of measurement required by a particular application.

Long term stability of the algal biosensor was monitored every day to compare the reference responses H_0 . The biosensor activity was continuously tested with intermittent flashes of light in the measuring cell at ambient temperature 24 hours a day. The daily mean values of the measurements are reported in Fig. 5. A decrease in oxygen production during the photosynthetic process is observed day after day. Under the above-mentioned conditions, about 50% of the algal activity in terms of oxygen production still remains after eight days. This could be improved by decreasing the light intensity, which results in a longer response time.

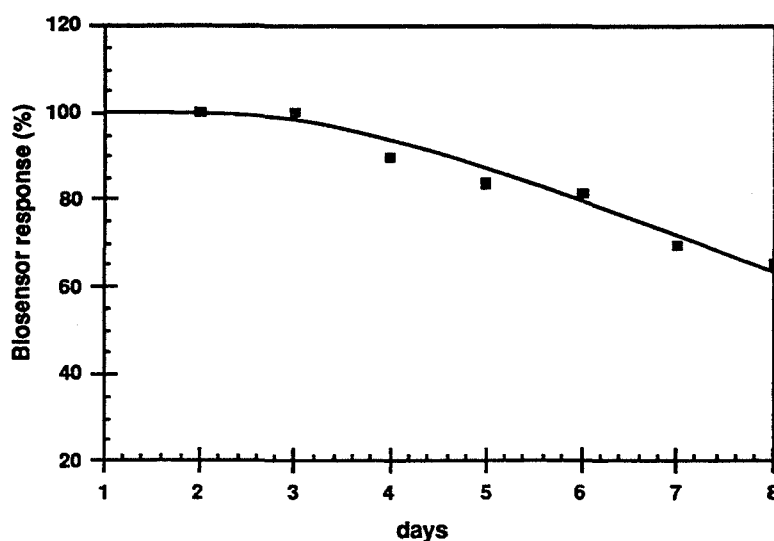


Fig. 5. Long term stability of the algal biosensor in continuous use in the chamber.

4. Conclusions

For the first time a whole-cell biosensor has been constructed in order to operate in the gas phase for determination of aerosols. Perchloroethylene is selected as an example to show the feasibility of the method. The use of an algal membrane allows direct determination of compounds in the gas phase without previous trapping of the analyte in a solution. In addition, real-time monitoring is possible with continuous measurement of the algae photosynthetic activity by an oxygen electrode. Other toxic compounds which act on the algal photosynthetic activity can be detected. Preliminary assays on atrazine and paraquat and as pesticides and methanol as solvent show an important inhibition of the algal activity. This biosensor can be considered as an effective early warning system to protect workers from harmful toxic aerosols.

References

- [1] J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, G. Reverdy, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 255.
- [2] K.R. Rogers, *Biosens. & Bioelectr.* 10 (1995) 533.
- [3] G.P. Evans, M.G. Briers, D.M. Rawson, *Biosensors* 2 (1986) 287.
- [4] D.M. Rawson, A.J. Wilmer, A.P.F. Turner, *Biosensors* 4 (1989) 299.
- [5] M.J. Dennison, J.M. Hall, A.P.F. Turner, *Analyst* 121 (1996) 1769.
- [6] G. Bitton, *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 13 (1983) 51.
- [7] C. Tran-Minh, *J. Biomol. Recog.* 9 (1996) 658.
- [8] S.A. Nielsen, T. Hougaard, *Atla* 21 (1993) 196.
- [9] H. Abou-Waly, M.M. Abou-Setta, H.N. Nigg, L.L. Mallory, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46 (1991) 223.
- [10] T. Shigeoka, Y. Takeda, K. Yoshida, F. Yamauchi, *Environ. Toxicol. Chem.* 7 (1988) 847.
- [11] M. Bruns, F. Li, *Supelco* 14 (1995) 10.
- [12] INRS Fiche toxicologique, no., 29 (1987) 40.

N° D'ORDRE : 181 CD

NOM : NAESSENS-PEREZ Martine

SUJET : Contribution à l'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et à la réalisation de biocapteurs.

SPECIALITE : Génie des Procédés

MOTS CLES : Ecotoxicologie - Herbicides - Solvants - Métaux - *Chlorella vulgaris* - Micro-algue - Chloroplaste - Electrode - Fluorescence chlorophyllienne - Fibres optiques - Biocapteur - Microscopie électronique à balayage - Analyse d'images.

RESUME Dans le cadre de la protection de l'environnement, l'eau et l'atmosphère sont deux milieux particulièrement surveillés. La réglementation impose la détection et le dosage d'une liste de produits mais les besoins analytiques sont considérables. Les méthodes biotechnologiques présentent l'avantage d'indiquer l'impact du produit sur la matière vivante. Ces méthodes sont mises en oeuvre au laboratoire ou sur site. La détection d'une toxicité globale ou ciblée, *in situ* et en temps réel, est privilégiée. Les biocapteurs sont des outils répondant à cette attente.

Au cours de l'étude, deux biocapteurs, l'un ampérométrique, l'autre fluorimétrique sont conçus. Tous deux intègrent le même biorécepteur, *Chlorella vulgaris*. Une nouvelle méthode d'immobilisation des micro-algues est mise au point. Elle permet d'obtenir des lots de membranes reproductibles, fonctionnelles 7 jours, donnant une réponse *in vivo* à valeur statistique, réutilisables et conservables. Des essais conduits sur des thylakoïdes extraits des cellules végétales ne donnent pas d'aussi bons résultats. L'association des membranes algales avec les deux types de transducteur montre que *Chlorella vulgaris* est sensible à des produits divers : herbicides, métaux, solvants. Les limites de détection pour des herbicides sont particulièrement basses, inférieures aux normes. Pour plusieurs produits testés, des courbes d'étalonnage sont données. Les deux types de biocapteur fonctionnent en milieu aqueux, en mode batch et en mode flux. Le biocapteur de fluorescence algale à fibres optiques possède des qualités de reproductibilité et de maniabilité plus intéressantes que le biocapteur ampérométrique. Le biocapteur de fluorescence est testé sur des lixiviats de bois, solutions naturelles complexes ; le biocapteur ampérométrique est adapté à l'utilisation en phase gazeuse, il détecte alors le méthanol vapeur et le perchloroéthylène en aérosol.

Une autre partie de l'étude consiste à caractériser l'impact des toxiques sur *Chlorella vulgaris*. L'analyse est conduite en microscopie électronique à balayage et en microscopie optique couplée à l'analyse d'images. Ces deux méthodes originales restent à perfectionner. Les résultats de nos essais préliminaires semblent encourageants pour la détection du produit toxique et l'accès à son mécanisme d'action.
